



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

LAISLA CAROLINA ANDRADE FERREIRA

**ISOLAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Caulerpa racemosa* E
AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA EM MODELO DE INFECÇÃO POR *Leishmania*
*sp.***

RECIFE

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

LAISLA CAROLINA ANDRADE FERREIRA

**ISOLAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Caulerpa racemosa* E
AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA EM MODELO DE INFECÇÃO POR *Leishmania*
*sp.***

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência
Animal da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do
grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador (a): Tania Maria Sarmento da Silva

*Bolsista FACEPE

RECIFE

2020

Dados Internacionais de Catalogação na
Publicação Universidade Federal Rural
de Pernambuco Sistema Integrado de
Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos
pelo(a) autor(a)

C292i FERREIRA, LAISLA CAROLINA ANDRADE
 ISOLAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Caulerpa racemosa* E AVALIAÇÃO
FARMACOLÓGICA EM MODELO DE INFECÇÃO POR *LEISHMANIA SP.* / LAISLA CAROLINA
ANDRADE FERREIRA. - 2020.
 134 f.

 Orientadora: TANIA MARIA SARMENTO DA SILVA.
 Coorientador: CELSO DE AMORIM
 CAMARA. Inclui referências e
 anexo(s).

 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-
Graduação em Biociência Animal, Recife, 2020.

 1. *Caulerpa racemosa*. 2. Cromatografia líquida. 3. Espectrometria de massas. 4.
Metabólitos secundários. 5. Atividade Leishmanicida. I. SILVA, TANIA MARIA SARMENTO
DA, orient. II. CAMARA, CELSO DE AMORIM, coorient. III. Título

CDD 636.089

LAISLA CAROLINA ANDRADE FERREIRA

**ISOLAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Caulerpa racemosa* E
AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA EM MODELO DE INFECÇÃO POR *Leishmania*
*sp.***

DISSERTAÇÃO AVALIADA E APROVADA PELA BANCA EM:

28/02/2020

Prof^a. Dr. Tania Maria Sarmiento da Silva – **Orientadora**

Prof^o. Dr. Celso de Amorim Camara (UFRPE) – **Examinador Interno**

Prof^a. Dra. Bárbara Viviane de Oliveira Santos (UFPB) – **Examinador Externo**

Prof^o. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire (UFPB) – **Examinador Externo**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas benções a mim concedida e pela realização deste sonho!

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de pós-graduação em Biociência Animal, pela oportunidade.

A minha mãe Maria Eunice por fazer o seu melhor para sempre trazer as condições necessárias para mim e meus irmãos estudarem. Muito obrigada, mãe! Agradeço a minha irmã Larissa por sempre ser uma companhia dentro de casa, uma parceira de conversas, por toda a paciência em ler este manuscrito e me dar um montão de dicas e aos meus irmãos Geremias e Lenon pelo cuidado para ver nossa família sempre bem, amo vocês!

Ao Prof. Celso de Amorim Camara por primeiro ter me recebido, inicialmente sendo “uma proposta para IC” que depois foi convertida em uma oportunidade para fazer o mestrado. Obrigada pela confiança, pela paciência, por ter me apresentado a minha orientadora e pelas correções deste trabalho. Gratidão!

Em especial, a minha orientadora Tania Maria Sarmento da Silva por ter me dado a oportunidade de ingressar neste meio acadêmico, pela paciência, pela confiança, pela dedicação a este trabalho, por todos os ensinamentos valiosos e por não medir esforços para que tudo ficasse da melhor forma possível. Gratidão!

A Profa. Bárbara Viviana de Oliveira Santos, por ter me concedido as amostras da alga, pelo aceite do convite para compor as bancas de qualificação e defesa do mestrado, pelas suas correções e ao seu aluno Vinicius pela colaboração nesse trabalho. Obrigada!

Ao Prof. Kristerson Reinaldo de Luna Freire, por compor as bancas de qualificação e defesa do mestrado, pelas suas correções e ensinamentos científicos. Obrigada!

Ao Prof. Dr. George Emmanuel Cavalcanti de Miranda da Universidade Federal da Paraíba pela identificação do material marinho. Obrigada!

Ao Prof. Pedro Roosevelt Torres Romão pela realização dos testes de viabilidades da *Leishmania* sp. Obrigada!

Aos colegas do BIOFITO, pela companhia de sempre, em especial gostaria de agradecer a Ayala Nara pela ajuda na etapa de cromatografia e dicas para correção e Rogélio Moreno pela ajuda para discutir os dados de Ressonância Magnética Nuclear. Muito Obrigada!

A todos que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (professores, alunos e técnicos), em especial a Coordenadora do Programa por sempre ser muito solícita em auxiliar os alunos com as pendências. Obrigada!

A Fundação de Amparo à ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos, Allyson Araújo, Paulo Rafael, Jéssicka, Rafael e Lucas pela força e incentivo durante estes dois anos e principalmente agora na etapa final. Obrigada!

Ao meu amor, Ana Clarissa Sales, pelo carinho, pela força, pelo incentivo, pela companhia, pelo apoio e por sempre acreditar em mim. Um “muito obrigada” jamais será suficiente para expressar o quanto eu sou grata a você. Obrigada por esta na minha vida e por ser esta pessoa maravilhosa. Te amo!

Por fim, aos meus anjinhos de quatro patas, Pandora e Nímue, pela recepção calorosa ao chegar em casa e por sempre trazerem alegria nos momentos que mais preciso. Amo vocês, filhotitas!!!

RESUMO

As algas marinhas são fontes promissoras de metabólitos secundários que podem ser utilizados na indústria farmacêutica. *Caulerpa racemosa* é conhecida como “*uvas-do-mar*” e habita próximo a superfície arenosa em águas profundas. É conhecida pelas atividades biológicas como ação antibacteriana, antifúngica, antidiabética, antioxidante, antinociceptiva, anti-inflamatória e leishmanicida. O presente trabalho teve como objetivo analisar o perfil químico e a atividade leishmanicida das frações obtidas através de extração em fase sólida (SPE) da alga *C. racemosa* contra a espécie de *Leishmania amazonensis*. A alga foi extraída com etanol e o extrato etanólico foi submetido ao fracionamento em SPE com metanol e água em proporções diferentes, sendo obtidas seis frações que foram analisadas por UPLC-ESI-qTOF-MS^E e submetidas ao testes de viabilidade celular em *L. amazonensis*. A análise permitiu identificar os alcaloides: monometil caulerpinato, caulerpina, ácido caulerpínico, caulersina, ácido caulerpínico e um novo composto derivado da caulerpina que foi isolado e identificado por técnicas espectroscópicas como sendo o etil metil caulerpinato. A atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* do extrato etanólico e das frações de *C. racemosa* foi significativa nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL. As principais substâncias identificadas na espécie *C. racemosa* foram alcaloides derivados da caulerpina e tanto o extrato etanólico bruto como as frações SPE apresentaram atividade leishmanicida.

PALAVRAS-CHAVES: *Caulerpa*; metabólitos secundários; atividade leishmanicida.

ABSTRACT

As seaweed is a promising source of secondary metabolites that can be used in the pharmaceutical industry. *Caulerpa racemosa* is known as “sea grapes” and lives close to the sandy surface in deep waters. It is known for biological activities such as antibacterial, antifungal, antidiabetic, antioxidant, antinociceptive, anti-inflammatory and leishmanicidal action. The present work aimed to analyze the chemical profile and the leishmanicidal activity of the activated fractions through the continuous phase extraction (SPE) of the algae *C. racemosa* against a species of *Leishmania amazonensis*. An algae was extracted with ethanol and the ethanol extractor was subjected to a relationship in the SPE with methanol and water in different proportions, being considered six fractions that were analyzed by UPLC-ESI-qTOF-MS^E and subjected to cell viability tests in *L. amazonensis*. An analysis selected to identify alkaloids: monomethyl caulerpinin, caulerpine, caulerpinic acid, caulersin, caulerpinic acid and a new compound derived from caulerpin which was used and identified by spectroscopic techniques such as methyl ethyl caulerpinato, a leishmanicidal activity against *L. amazonensis* from ethanol extract and from fractions of *C. racemosa* were significantly affected at 5, 10 and 20 µg / mL. As the main substances identified in the species *C. racemosa*, alkaloids used in kaolin and both or crude ethanolic extract, such as the SPE fractions reported leishmanicidal activity were found.

KEYWORDS: *Caulerpa*; secondary metabolites; leishmanicidal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Anatomia e variações morfológicas em espécies do Gênero <i>Caulerpa</i>	22
Figura 2.	Principais rotas biossintéticas envolvidas na síntese de metabólitos secundários.....	24
Figura 3.	Possíveis alcaloides identificados nas frações obtidas por SPE da <i>C. racemosa</i>	38
Figura 4.	Cromatograma UPLC-DAD (254, 314, 400 nm) e pico íon base (BPI) da fração MeOH (10%) da <i>C. racemosa</i> obtidos por UPLC- <i>q</i> TOF-MS ^E em modo positivo.....	39
Figura 5.	Cromatograma do íon pico base para a fração de SPE MeOH (10%) da <i>C. racemosa</i> obtido por UPLC- <i>q</i> TOF-MS ^E em modo positivo.....	40
Figura 6.	Cromatograma UPLC-DAD (256, 314, 400 nm) e íon pico base (BPI) da fração MeOH (30%) da <i>C. racemosa</i> obtido por UPLC- <i>q</i> TOF-MS ^E em modo positivo.....	42
Figura 7.	Cromatograma do íon pico base para a fração de SPE MeOH (30%) obtido por UPLC- <i>q</i> TOF-MS ^E em modo positivo.....	43
Figura 8.	Cromatograma UPLC-DAD (256, 314, 400 nm) e ESI íon pico base (BPI) da fração MeOH (50%) da <i>C. racemosa</i> obtido por UPLC- <i>q</i> TOF-MS ^E em modo positivo.....	45
Figura 9.	Cromatograma para a fração de SPE MeOH (50%) e íon pico base obtido por UPLC- <i>q</i> TOF-MS ^E em modo positivo.....	46
Figura 10.	Cromatograma UPLC-DAD (252, 314 nm) e íon pico base (BPI) da fração MeOH (70%) da <i>C. racemosa</i> obtido por UPLC- <i>q</i> TOF-MS ^E em modo positivo.....	48
Figura 11.	Cromatograma do íon pico base para a fração de SPE MeOH (70%) obtido por UPLC- <i>q</i> TOF-MS ^E em modo positivo.....	49
Figura 12.	Cromatograma UPLC-DAD (257, 314, 400 nm) e íon pico base (BPI) da fração MeOH (100%) da <i>C. racemosa</i> obtido por UPLC- <i>q</i> TOF-MS ^E em modo positivo.....	51
Figura 13.	Cromatograma do íon pico base para a fração de SPE MeOH (100%) obtido por UPLC- <i>q</i> TOF-MS ^E em modo positivo.....	52

Figura 14.	Cromatograma UPLC-DAD (257 nm) e ESI íon pico base (BPI) da fração AcOEt da <i>C. racemosa</i> obtido por UPLC- <i>q</i> TOF-MS ^E em modo positivo.....	54
Figura 15.	Cromatograma para a fração de SPE AcOEt do íon pico base obtido por UPLC- <i>q</i> TOF-MS ^E em modo positivo.....	55
Figura 16.	Espectros de UV, massas e proposta de formação dos íons produtos do ácido caulerpínico.....	60
Figura 17.	Espectros de UV, massas e proposta de formação dos íons produtos do monometil caulerpinato.....	61
Figura 18.	Espectros de UV, massas e proposta de formação dos íons produtos da caulerpina.....	62
Figura 19.	Espectros de UV, massas e proposta de formação dos íons produtos da caulersina.....	65
Figura 20.	Espectros de massas e proposta de formação dos íons produtos do etil metil caulerpinato.....	67
Figura 21.	Espectro de infravermelho (IV) e ultravioleta (UV) do etil metil caulerpinato.....	69
Figura 22.	Espectro de RMN de ¹ H do etil metil caulerpinato com expansões (800MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	72
Figura 23.	Espectro de RMN de ¹³ C do etil metil caulerpinato (800MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	74
Figura 24.	Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C na região 110-190 ppm do etil metil caulerpinato (800MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	75
Figura 25.	Expansão do espectro de HSQC do etil metil caulerpinato mostrando a correlação de CH ₂ ¹³ C 60.83 e ¹ H δ 4.28 ppm.....	76
Figura 26.	Espectro de HMBC com expansão do etil metil caulerpinato mostrando a correlação entre os sinais de CH ₂ 60.83 e CH ₃ δ _H 1.46.....	77
Figura 27.	Estrutura química proposta para o etil metil caulerpinato e seu híbrido de ressonância.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Caracterização dos compostos da alga <i>C. racemosa</i> SPE Fr MeOH (10%) por UPLC- <i>q</i> TOF-MS ^E	41
Tabela 2.	Caracterização dos compostos da alga <i>C. racemosa</i> SPE Fr MeOH (30%) por UPLC- <i>q</i> TOF-MS ^E	44
Tabela 3.	Caracterização dos compostos da alga <i>C. racemosa</i> SPE Fr MeOH (50%) por UPLC- <i>q</i> TOF-MS ^E	47
Tabela 4.	Caracterização dos compostos da alga <i>C. racemosa</i> SPE Fr MeOH (70%) por UPLC- <i>q</i> TOF-MS ^E	50
Tabela 5.	Caracterização dos compostos da alga <i>C. racemosa</i> SPE Fr MeOH (100%) por UPLC- <i>q</i> TOF-MS ^E	53
Tabela 6.	Caracterização dos compostos da alga <i>C. racemosa</i> SPE Fr AcOEt por UPLC- <i>q</i> TOF-MS ^E	56
Tabela 7.	Dados de RMN de ¹ H do etil metil caulerpinato registrados em DMSO- <i>d</i> ₆	73
Tabela 8.	Concentração inibitória (IC ₅₀) das frações obtidas por SPE e extrato etanólico da <i>C. racemosa</i> para a ação leishmanicida com <i>L. amazonensis</i>	83

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Etapas de extração da <i>Caulerpa racemosa</i>	34
-------------------	--	----

LISTA DE GRAFÍCOS

- Gráfico 1.** Viabilidade de *L. amazonensis* verificada por ensaio de MTT do extrato etanólico obtido por SPE da *C. racemosa*.....79
- Gráfico 2.** Viabilidade de *L. amazonensis* verificada por ensaio de MTT das frações obtidas por SPE da *C. racemosa*: **(a)** Fr 10 (%) MeOH; **(b)** Fr 30 (%) MeOH; **(c)** Fr 50 (%) MeOH; **(d)** Fr 70 (%) MeOH; **(e)** Fr 100 (%) MeOH; **(f)** Fr AcOEt.....81

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

δ	Deslocamento químico
AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
MeOH	Metanol
nm	Nanomêtro
ppp	Partes por milhão
<i>q</i>	Quarteto
RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono
HR-ESI-MS	High resolution – Electrospray ionization mass
<i>t</i>	Tripleto
UV	Radiação ultravioleta
HMBC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS E TAXONÔMICAS DAS ALGAS DO GÊNERO <i>CAULERPA</i>	19
2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS ALGAS DO GÊNERO <i>CAULERPA</i>	22
2.2.1 Artigo de revisão	24
2.3 LEISHMANIOSES.....	25
2.3.1 Epidemiologia das Leishmanioses.....	25
2.3.2 Atividade leishmanicida dos extratos/frações de algas	27
3. OBJETIVOS	30
3.1 GERAL	30
3.2 ESPECÍFICOS.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 EQUIPAMENTOS E REAGENTES	31
4.2 MATERIAL VEGETAL.....	31
4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)	32
4.4 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC)	32
4.5 ATIVIDADE LEISHMANICIDA	35
4.5.1 Biossegurança	35
4.5.2 Cultura de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	35
4.5.3 Atividade leishmanicida das frações de <i>c. racemosa</i> sobre formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	35
4.5.4 Análise estatística	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 ANÁLISE DAS FRAÇÕES OBTIDAS DE SPE POR UPLC-PDA-QTOF-MS ^E	37
5.1.1 Alcaloides por UPLC-DAD-qTOF-MS ^E	57
5.1.2 Espectro de massas do <i>etil metil caulerpinato</i>	63
5.2 ESPECTROS DE ULTRAVIOLETA, INFRAVERMELHO, RMN DE ¹ H E RMN DE ¹³ C DO ETIL METIL CAULERPINATO.....	67
5.3 ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO EXTRATO E DAS FRAÇÕES DE SPE DA CAULERPA RACEMOSA	78
CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	84

1. INTRODUÇÃO

Os oceanos abrigam grande parte da biodiversidade global, o que configura ao ambiente marinho uma excelente fonte de produtos naturais bioativos. Esses produtos, em sua maioria, não estão disponíveis no ambiente terrestre (SRIVASTAVA et al., 2010). Essa ampla diversidade de substâncias bioativas, tão distintas estruturalmente foram produzidas pelos organismos marinhos para adaptação ao ambiente hostil (TEIXEIRA et al., 2013). Como exemplo, acomodações para sobrevivência em substratos arenosos ou lodosos, além de formação, a partir de seus fragmentos residuais, de complexas comunidades flutuantes como no Mar de Sargaços e no Triângulo das Bermudas (OLIVEIRA et al., 2009).

A síntese desses produtos naturais ou metabólitos secundários ocorrem em grupos específicos de organismos, tais compostos atuam como mediadores de interações ecológicas. Dentre esses organismos, enquadram-se as algas marinhas verdes (CABRITA et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2013). Estudos químicos científicos sobre produtos naturais oriundos de algas no mundo, principalmente no Brasil são importantes para contribuir com as pesquisas científicas nos ramos da indústria farmacêutica e alimentícia, tendo em vista que elas participam como proponentes promissores na elaboração de alimentos funcionais e nos âmbitos de saúde e bem-estar (ZUBIA et al., 2019).

Nesse contexto, o gênero *Caulerpa* tem sido estudado, o qual é bastante variado e comporta mais de 100 espécies reconhecidas em todo o mundo (MARINLIT, 2020). A literatura relata ampla variedade de substâncias isoladas nas espécies do gênero *Caulerpa* entre elas, alguns alcaloides (AGUILAR-SANTOS, 1970; MAO et al., 2006; LIU et al., 2012; ORNANO et al., 2014), terpenos e esteroides (GUERREIRO et al., 1992; SMYRNIOTOPOULOS et al., 2003; LIU et al., 2013). Estudos demonstram que extratos e metabólitos secundários de espécies do gênero *Caulerpa* exibem propriedades farmacológicas de interesse como antibacteriana (SMYNIOTOPOULOS et al., 2003; SRIVASTAVA et al., 2010; CHANDRASEKARAN et al., 2014), antifúngica (LIU et al., 2013), antidiabética (SHARMA et al., 2014), antioxidante (SHALABY et al., 2011), antinociceptiva (DA MATTA et al., 2011; SOUZA et al., 2009;

CAVALCANTI-SILVA et al., 2014), anti-inflamatória (BITERCOURT et al., 2011; SUN et al., 2018) e antiparasitária (SOARES et al., 2012).

SOUSA (2016) em estudo com *Caulerpa racemosa* coletada na Paraíba-Brasil isolou a caulerpina (CLP), um alcaloide natural encontrado em espécies deste gênero, a qual foi utilizada como substrato de partida para a síntese do ácido caulerpínico, a partir dele nove novos análogos foram produzidos através de semi-síntese. Apesar de ter sido sintetizado no estudo citado acima, o ácido caulerpínico é um produto natural isolado das espécies *C. sertularioides* (SCHWEDE et al., 1987), *C. mexicana* (PAUL et al., 1987), como também de *C. racemosa* (AGUILAR-SANTOS, 1970; NIELSEN et al., 1982; ANJANEYULU et al., 1991; ORNANO et al., 2014). Tal trabalho comprovou a atividade leishmanicida contra espécies de *Leishmania amazonensis* do ácido caulerpínico conseguido a partir da caulerpina (CLP). Além do mais, fração polissacarídica extraída da *C. racemosa*, coletada na costa de Fortaleza-Brasil foi efetiva na inibição no crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* (PIRES et al., 2013).

Neste contexto, vale esclarecer que as leishmanioses são doenças infecciosas pertencentes ao grupo de doenças tropicais negligenciadas causada por protozoários do gênero *Leishmania* (LAINSON, 1987) que afeta principalmente países em desenvolvimento e de clima tropical como Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão, mas com ocorrência em mais de 98 países. De acordo com a Organização Mundial de Saúde ela é uma das sete doenças tropicais mais importantes do mundo, na sua forma mais grave (leishmania visceral) a taxa de letalidade ultrapassa 95%. Portanto, ela representa sério problema para a saúde mundial e do Brasil (TORRES-GUERREIRO et al., 2017; PALIC, 2019).

Posto isto, as pesquisas relacionando os produtos naturais têm sido exploradas nos últimos anos, uma vez que elas podem proporcionar bons resultados em suas ações biológicas, a fim de ampliar as opções para o tratamento de doenças como a leishmaniose. Tais trabalhos podem ser mais precisos por causa dos avanços na performance das inovações tecnológicas em cromatografia líquida, de ultra pressão, acopladas à espectrometria de massas de alta resolução, tal qual permite suporte para uma infinidade de estudos

metabolômicos em espécies vegetais, assim como em outros organismos (FARAG et al., 2012; SUMNER et al., 2003).

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo contribuir com o estudo de metabólitos secundários da *C. racemosa* usando UPLC-PDA-qTOF-MS², bem como avaliar o potencial leishmanicida das frações obtidas por extração em fase sólida (SPE), a partir do extrato etanólico, dada a importância epidemiológica da leishmaniose e considerando os relatos na literatura referente aos estudos com a espécie *C. racemosa* e suas atividades biológicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS E TAXONÔMICAS DAS ALGAS DO GÊNERO *CAULERPA*

A família Caulerpaceae é da ordem das Bryopsidales (Ulvophyceae, Chlorophyta) representada por um único gênero *Caulerpa* (WYNNE, 2005). Em pesquisas recentes de filogenia baseando-se em reconstrução de genomas de cloroplasto, a Caulerpaceae foi colocada em uma classificação diferente, sendo essa considerada parente de uma Halimedaceae mais amplamente circunscrita. Esta nova classificação reúne as famílias Pseudocodiaceae, Rhipiliaceae e Udoteaceae, além de designar nova divisão de tribos para as diferentes linhagens descobertas, a qual incluiu duas delas ainda não descritas (CREMEN et al., 2018).

O gênero *Caulerpa* contém cerca de 160 espécies com nomes no banco de dados (BASEALGAE), dentre os quais 97 foram sinalizados como taxonomicamente aceitos com base na literatura listada sob o nome da espécie (GUIRY, 2020). Observa-se nesse gênero um tanto de variação morfológica com o habitat (Figura 1), a exemplo disto, a alga *Caulerpa racemosa* possui quatro variações: *C. racemosa* var. *uvifera* (C. Agardh) J. Agardh (1873), *C. racemosa* var. *clavifera* (Turner) Weber Bosse (1898), *C. racemosa* var. *disticha* V.J. Chapman (1977) e *C. racemosa* var. *mucronata* L. N. de Senerpont Domis (2003) (BELTON et al., 2019; GUIRY, 2020).

As caulerpas são encontradas em abundância em águas marinhas rasas, em regiões tropicais e subtropicais, com algumas espécies se estendendo para o Mar Mediterrâneo e regiões temperadas da Austrália (GUIRY, 2020). No Brasil, localiza-se algumas na região Nordeste, especificamente no litoral de Pernambuco e Arquipélago de Fernando de Noronha, tendo sido identificadas 17 espécies na região (PERREIRA et al, 2002; OLIVEIRA-CARVALHO et al., 2003). Além dessas, na Paraíba, exclusivamente no município de Pitimbu, 5 espécies de *Caulerpa*: *C. lanuginosa* J. Agardh, *C. kempfii* (Forsskal) J. V. Lamouroux, *C. kempfii* A. B. Joly & S. Pereira, *C. mexicana* Sonderex Kutzing, *C. verticillata* J. Agardh e *C. sertularioides* foram referidas (LUCENA et al., 2007).

Morfofisiologicamente, as algas deste gênero consistem numa única célula multinucleada, e se diferenciam das outras algas verdes coenocíticas pela presença de crescimento da parede celular, formando uma estrutura denominada trabécula, cujo conjunto constitui uma anastomose, servindo de suporte estrutural (ZUBIA et al., 2019). Essas algas possuem uma organização de talo coenocítico, ou seja, cada talo é essencialmente uma única célula que se desenvolve em um complexo sistema de sífios ramificados. O estolão horizontal é ancorado por rizoides incolores e ramos verticais que englobam ramificações distintas e servem para identificação das espécies (BRAYNER et al., 2008) (BELTON et al., 2019; GUIRY, 2020)

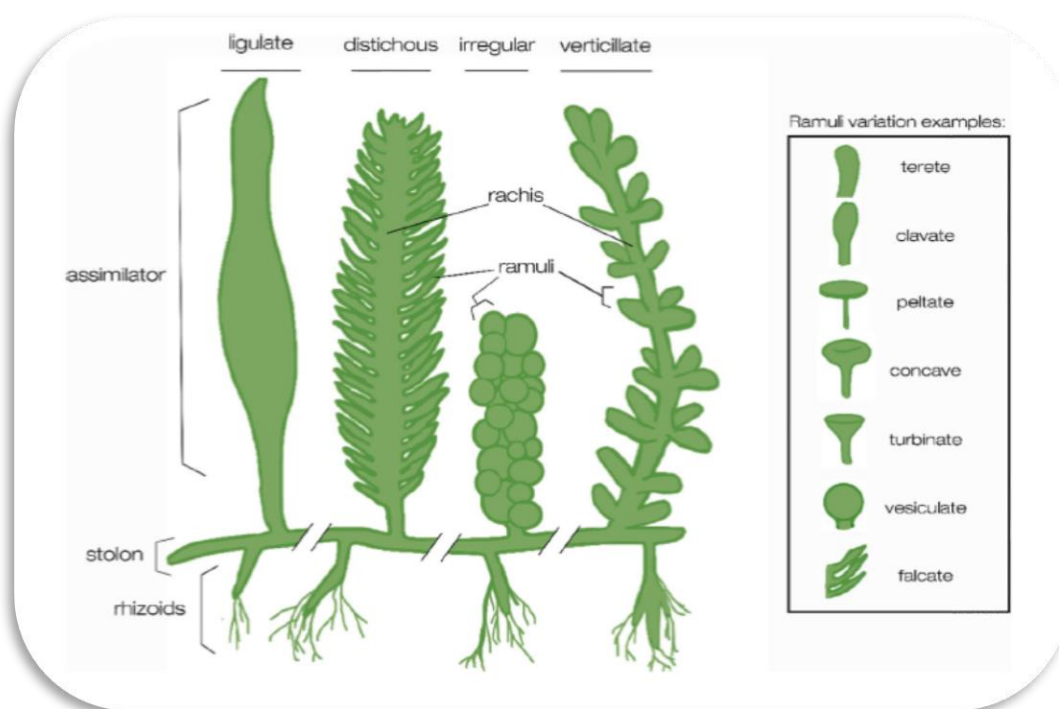
O desenvolvimento dessas algas dá-se em qualquer tipo de substrato, e sua proliferação é facilitada pela capacidade de sintetizar algumas toxinas que inibem o crescimento de outras algas próximas (GALGANI, 1996). Entretanto, são muito sensíveis a algumas condições ambientais como, por exemplo, salinidade, irradiância, temperatura e concentração de nutrientes (CHEN et al., 2019)

Ao que concerne o ciclo da vida das caulerpas, a literatura relata poucos estudos acerca de sua descrição, apesar de ser um importante elemento para entender a sua biologia. Sabe-se que as espécies de *Caulerpa* têm um ciclo de vida sexual diplomático: uma fase vegetativa diploide ($2n$) e outra biflagelada haploide ($1n$) no que corresponde aos seus gametas (CLIFTON., 1999; COLLADO-VIDES, 2002).

Elas se reproduzem especialmente de forma assexuada (onde não há presença de gametas) pela fragmentação do stolon, no entanto, a reprodução sexual (presença de gametas) ocorre em algumas espécies por anisogamia holocárpica. A formação de seus gametas advindo da meiose acontece na gametogênese, esta etapa processa-se em áreas não modificadas do tálus, os gametas produzidos são liberados em extrusões gelatinosas através de papilas superficiais. Na *C. okamura* o sistema é monóico, ou seja, com ambos os sexos separados por todo o tálus, enquanto na *C. prolifera* o sistema é dióico, não existe a separação (GUIRY, 2020). As histórias de vida das espécies deste gênero são variadas, elas podem apresentar diferentes níveis de ploidia, ademais de diferentes domínios de fase em distintas regiões geográficas (ZUBIA et al., 2019).

A respeito da *Caulerpa racemosa*, ela é conhecida como “*uvas-do-mar*”, seu hábitat é próximo a superfície arenosa em águas profundas (chegando a 100 metros de profundidade) de mares temperados e tropicais. Morfologicamente, consiste numa célula multinucleada, não-septada, com cloroplasto livre e possui uma rede de fibras proteicas que ajudam no movimento de suas organelas. Externamente observa-se pequenos “galhos” curtos e eretos, os quais são extensões do estolão horizontal que servem para ancorá-las no substrato, esses pequenos galhos atingem até 30 cm de comprimento. A sua reprodução se dá por fragmentação (assexuada) e seu crescimento ocorre nos meses de abril a dezembro, tendo variações morfológicas de acordo com o local de proliferação. Em águas calmas e turvas aparecem muitos galhos eretos, enquanto próximas às rochas e corais apresenta ramos curtos e fortes (KUMAR et al., 2019).

Figura 1. Anatomia e variações morfológicas em espécies do Gênero *Caulerpa*



Fonte: ZUBIA et al., 2019

2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS ALGAS DO GÊNERO *CAULERPA*

As substâncias orgânicas encontradas em qualquer organismo são provenientes de seu metabolismo, o conjunto de reações químicas que continuamente ocorrem no interior de uma célula viva. Os processos reacionais são descritos por vias metabólicas que incluem fragmentação (catabolismo) e construção (anabolismo) de moléculas, designadas como metabólitos (KERBAUY, 2004).

Separam-se esses metabólitos em dois grupos principais: os primários e os secundários. No primeiro localizam-se os carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucléicos (DNA e RNA), todos esses são materiais poliméricos formados por blocos construtores menores. Os carboidratos são construídos por unidades de açúcares, ao passo que as proteínas são arranjos de aminoácidos e os ácidos nucléicos baseados em monômeros de nucleotídeos, todas elas consideradas desde sempre essenciais à sobrevivência de todos os seres vivos (TAIZ, 2009).

O segundo grupo dispõe-se em menores proporções (quando comparados aos primários). A princípio não possuem função direta nos processos fisiológicos inerentes à vida, tais compostos encontram-se em

organismos específicos. Eles são uma expressão da individualidade da espécie, além de não serem produzidos constantemente, por isso a sua distribuição é mais limitada (DEWICK, 2009). Na maioria dos casos a funcionalidade para o organismo produtor é desconhecida, mas entende-se que muitos deles funcionam como mediadores químicos nas interações organismo-ambiente, na defesa frente a predadores e entre outras funções, de modo que favorece a permanência da espécie no ambiente (TAIZ, 2009; TEIXEIRA et al., 2013).

As rotas biossintéticas para a produção de metabólitos secundários apresentam alta complexidade, sofrem influência direta de fatores ambientais (luz, temperatura, solo, água etc.) e são dependentes do material genético. Juntos, esses fatores modulam a qualidade e a quantidade dos produtos gerados pelo organismo (GOBBO-NETO et al., 2007). Apesar de serem oriundos de processos complexos e possuírem uma grande diversidade estrutural, todos estes se originam a partir de substratos advindo do metabolismo primário canalizados por quatro vias metabólicas principais (Figura 2): acetato, ácido chiquímico, mevalonato e fosfato de desoxililulose. Entre os principais grupos de produtos naturais, há os fenóis, prostaglandinas, ácidos graxos, derivados cinâmicos, lignanas, alcaloides, terpenoides e esteroides (DEWICK, 2009).

“*Marinlit*” reunindo os principais trabalhos com ano de publicação de 1966 a 2020. O artigo encontra-se em anexo (Anexo 1).

2.3 LEISHMANIOSES

2.3.1 Epidemiologia das Leishmanioses

A leishmaniose é uma doença tropical infecciosa causada por protozoários parasitas intracelulares do Gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae) transmitidos por picada de flebotomíneos fêmea, em especial do Gênero *Phlebotomus*, em países do velho mundo e *Lutzomyia*, em países do novo mundo, podendo afetar tanto humanos como animais (WHO, 2019).

Apresenta-se em três principais manifestações clínicas: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral (calazar), as quais variam de acordo com a espécie do parasita, sistema imunológico e carga genética do hospedeiro (ANDRADE-NARVÁEZ, 2001; SUNYOTO, 2018). A manifestação clínica cutânea da doença afeta macrófagos residentes da pele, causando úlceras que cicatrizam lentamente, principalmente na região da face, braços e pernas, enquanto a manifestação mucocutânea leva a destruição parcial ou total das membranas mucosas da boca, nariz e garganta, podendo causar deformações. A manifestação visceral é crônica e afeta as células do sistema de fagócitos mononucleares do fígado, baço, medula óssea, linfonodos e intestino, ocasionando hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, pancitopenia, anemia, hipergamaglobulinemia e leucopenia ou trombocitopenia, febre, apatia e morte (YAMTHE, 2017; BENNIS, 2018; WHO, 2019).

Em relação às espécies do parasita que acarretam as diferentes manifestações clínicas, a leishmaniose cutânea é causada por uma grande variedade de espécies de *Leishmania*, incluindo *Leishmania mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. aethiopica*, *L. venezuelensis*, *L. lainsoni*, *L. shawi*, *L. peruviana*, *L. naiffi*, *L. lindenbergi*, *L. infantum*, *L. martiniquensis* e *L. waltoni* no Novo Mundo e *L. tropica*, *L. aethiopica* e *L. major* no Velho Mundo. Ao passo que as espécies de *Leishmania* que causam leishmaniose visceral incluem *L. donovani*, *L. infantum*, *L. martiniquensis* e *L. tropica* (YAMTHE, 2017).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a leishmaniose pertence ao grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas porque afeta principalmente as populações mais precárias das regiões tropical e subtropical do planeta, locais onde o mosquito habita (WHO, 2019). A maior prevalência da doença em regiões pobres está associada a condições de vida precárias, mal nutrição, desmatamento, deslocamento e aumento da população e falta de saneamento básico (SOUSA, 2016; SUNYOTO, 2018). É considerada uma das sete doenças tropicais mais importantes, perdendo apenas para malária como a doença parasitária que mais mata no mundo, portanto, representa um sério problema para a saúde pública mundial (TORRES-GUERREIRO, 2017).

Distribui-se mundialmente, tendo prevalência em cerca de 98 países, dispostos pelos continentes da Ásia, África, nas Américas e no Mediterrâneo. Entre 12 e 15 milhões de pessoas no mundo estão infectadas e 350 milhões estão em risco de contrair a doença. Estima-se que 700 mil a 1 milhão de novos casos ocorrem a cada ano, com cerca de 40 a 60 mil óbitos anuais. A leishmania cutânea é a manifestação clínica mais comum da doença, registrando entre 700.000 a 1 milhão de novos casos a cada ano, sendo mais de 70% dos casos registrados em somente 10 países, dentre os quais encontra-se o Brasil e outros países (Afeganistão, Argélia, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, República Islâmica do Iran, Peru, Sudão e Síria). A leishmania visceral é a forma mais grave de leishmaniose, registra cerca de 50 a 90 mil casos a cada ano no mundo, porém estima-se que somente 25% a 45% dos casos são reportados e dos reportados mais de 90% ocorrem em apenas seis países (Brasil, Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul e Etiópia) (ALVAR, 2012; YAMTHE, 2017; PALIC, 2019; WHO, 2019).

2.3.2 Atividade leishmanicida dos extratos/frações de algas

.

Na literatura encontram-se estudos com espécies de algas marinhas que obtiveram ação biológica contra espécies de *Leishmania* sp.

A respeito disto, um estudo com quatro espécies de algas, três algas marrons *Bifurcaria bifurcata* (R. Ross), *Dictyopteris polypodioides* (A.P. de Candolle) J.V. Lamouroux, *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V. Lamouroux e a alga vermelha *Dilsea carnosa* (Schmidel) Kuntz foram coletadas na costa da França, as quais tiveram extrato preparado com o solvente acetato de etila. As soluções extrativas de cada espécie foram testadas *in vitro* contra eritrócitos infectados com amastigotas de *Leishmania donovani* exibindo atividade leishmanicida significativa, a qual foi evidenciada pelos dados de concentração inibitória (IC₅₀) em 3,8 µg/ml para a espécie *B. bifurcata*, 10,8 µg/ml para *D. polypodioides*, 8,8 µg/ml para *D. dichotoma* e 9,5 µg/ml para *D. carnosa* (VONTHRON-SÉNÉCHEAU, 2011).

Ainda, em outro estudo, algas marinhas *Caulerpa sertularioides*, *Gracilaria corticata*, *Gracillaria salicornia* e *Sargassum oligocystum*, coletadas da costa do Golfo Persa, tiveram seus extratos aquosos (a quente e a frio) testados para atividades *in vitro* contra formas promastigotas da *Leishmania major*. Os resultados mostraram que todos os extratos preparados possuem atividade leishmanicida e seus dados de concentração inibitória para o extrato de água quente foram: IC₅₀ ≤ 85 µg/ml, para *C. sertularioides*, IC₅₀ ≤ 38 µg/ml para *Gracilaria corticata*, IC₅₀ ≤ 46 µg/ml para *G. salicornia* e IC₅₀ ≤ 78 µg/ml para *Sargassum oligocystum*, enquanto que os valores para extratos de água fria foram: IC₅₀ > 125 µg/ml para *C. sertularioides*, IC₅₀ > 65 µg/ml para *G. corticata*, IC₅₀ > 74 µg / ml para *G. salicornia* e IC₅₀ > 105 µg / ml para *Sargassum oligocystum* (FOULADVAND, 2011).

Além disso, um estudo realizado no Rio de Janeiro investigou a ação leishmanicida de duas populações da alga vermelha *Laurencia dendroidea*. A primeira população (A) foi coletada em Angra dos Reis - Rio de Janeiro e a segunda população (B) em Manguinhos - Espírito Santo. Para tal foi utilizado o extrato lipofílico bruto, o qual apresentou boa atividade contra as formas promastigotas da *Leishmania amazonensis*, com IC₅₀ = 17,9 ± 1,3 µg/mL para o extrato A e IC₅₀ = 34,2 ± 1,5 µg/mL para o extrato B. O extrato A também foi

ativo para as formas amastigota de *L. amazonensis* com valores de IC₅₀ de 8,7 ± 0,7 µg / mL e 10,8 ± 2,3 µg / mL, respectivamente (MACHADO, 2011).

Em estudo realizado com espécie da alga vermelha *Bostrychia tenella* J. AGARDH (Rhodomelaceae, Ceramiales) coletadas da costa de São Paulo, as amostras foram submetidas a extração com solventes diclorometano e metanol na proporção 2:1. O extrato resultante foi fracionado por partição com solventes orgânicos (hexano e diclorometano) formando as frações n-hexano (BT-H) e diclorometano (BT-D), que mostraram potencial leishmanicida em testes biológicos com *L. amazonensis*. Posteriormente, por cromatografia em coluna (Sílica Gel) as frações BT-H e BT-D produziram as subfrações H02, H03, D01 e D02, as quais foram também ativas contra *L. amazonensis* exibindo valores de IC₅₀ de 1,5, 2,7, 4,4 e 4,3 µg / mL, respectivamente (FELÍCIO, 2010).

Pesquisa realizada com a alga marrom *Canistrocarpus cervicornis* coletada em Pernambuco confirmou a ação leishmanicida dos extratos de acetato de etila, metanólico, diclorometano, da fração acetato de etila e do composto diterpeno, 4-acetoxydolastane, isolado por cromatografia (Sílica em Gel) contra formas promastigotas da *L. amazonensis*, obtendo IC₅₀ em 50 µg/mL, 100 µg/mL, 20 µg/mL, 8 µg/mL e 2 µg/mL, respectivamente (SANTOS, 2011).

Além dos estudos supracitados envolvendo algas de diversos gêneros, a atividade leishmanicida foi também relatada em estudos com a espécie *C. racemosa*. Uma amostra que foi coletada do Mar Mediterrâneo teve seu extrato metabólico testado contra formas amastigotas de *L. Donovanii*, sendo este efetivo no combate ao parasita com IC₅₀ em 22,6 µg/mL (SÜZGEÇ-SELÇUK, 2011). Além disso, a fração de polissacarídeos sulfatados extraída de *C. racemosa* coletada na costa de Fortaleza foi purificada e testada por meio de ensaios *in vitro*, demonstrando ação significativa na inibição no crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* obtendo um valor de IC₅₀: 34,5 µg/mL (PIRES et al., 2013).

Ainda, o extrato etanólico de *C. racemosa* coletada da costa do Paquistão foi testado contra formas promastigotas da *L. Major*, confirmando atividade significativa com IC₅₀ em 37,5 µg/mL. Nesse mesmo estudo foi testado também o extrato de outra espécie de *Caulerpa*, a *C. faridii* com IC₅₀ em 34 µg/mL (SABINA et al., 2005).

Neste contexto, os estudos com produtos naturais das algas marinhas se tornam uma importante fonte de pesquisa para alternativas de tratamento contra a leishmaniose e outras doenças. Tendo em vista que a maioria dos medicamentos atualmente disponíveis no mercado para o tratamento das leishmanioses são caros, bem como exigem um longo período de uso e causam grande quantidade de efeitos colaterais, por isso a necessidade do desenvolvimento de novas terapias (LIRA, 2015). Assim sendo, a proposta para este trabalho é contribuir com os estudos acerca dos metabólitos secundários da *C. racemosa* e testar suas frações obtidas por extração em fase sólida (SPE) frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar o perfil químico das frações obtidas por extração em fase sólida (SPE) e verificar a atividade leishmanicida frente a formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Obter as frações através de SPE e em cromatografia em coluna (CC) a partir do extrato etanólico da alga *C. racemosa*;
2. Analisar o perfil químico por UPLC-DAD-qTOF-MS² das frações de *C. racemosa*;
3. Avaliar a viabilidade de espécies de *L. amazonensis* frente as frações de SPE da alga *C. racemosa*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS E REAGENTES

Os experimentos foram realizados utilizando-se um cromatógrafo líquido de ultra eficiência ACQUITY UPLC H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, EUA), acoplado a um espectrômetro de massas Quadupolo-Tof (Xevo G2-XS QToF, Waters, EUA) com ionização por eletrospray (ESI). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna ACQUITY UPLCTM BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7µm, Waters, EUA) a 40°C. A fase móvel binária consistiu-se em água 0,1% de ácido fórmico (fase móvel A) e acetonitrila 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B). O fluxo foi de 0,4 mL/min e o volume de injeção foi de 3,0 µL. O gradiente de eluição utilizado foi: 0.0 a 8.0 min 40% - 99% de B; 8.0 a 9,0 min – 99% de B, o monitoramento foi feito a 340 nm.

O espectrômetro de massas foi operado em modo negativo e positivo de ionização (ESI⁻ e ESI⁺) no modo sensibilidade. A detecção foi implementada no modo centróide MS^E em uma faixa de massa de 50-1200 Da. Todas as análises foram realizadas utilizando o lockspray para garantir a precisão e reprodutibilidade dos valores de massas. Leucina-encefalina (5 ng.mL⁻¹) foi utilizado como padrão/referência para calibração.

4.2 MATERIAL VEGETAL

As amostras da alga *Caulerpa racemosa* foram coletadas na Praia de Ponta de Campina e no litoral da cidade de Pitimbu, coordenadas 7°07'31"S; 34°49'25", no Estado da Paraíba/Brasil. A coleta e a identificação foram feitas pelo Prof. Dr. George Emmamuel Cavalcanti de Miranda do Departamento de Biologia Molecular/CCEN/UFPB e uma exsicata foi depositada no herbário Professor Lauro Pires Xavier da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) com o número JPB 62814. O material coletado foi seco ao sol, posteriormente separado de outras epítetas e submetido à exaustiva extração com etanol.

4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

A alga *C. racemosa* (200,0 g) foi extraída com etanol exaustivamente em banho de ultra-som. O extrato foi filtrado e concentrado usando um evaporador rotativo fornecendo o extrato etanólico (2,0 g). Uma parte do extrato etanólico (1,0 g) foi dissolvida com metanol e água desionizada acidificada (ácido acético) (pH 2). O cartucho Phenomenex C-18 SPE foi condicionado com 10 mL de metanol e 10 mL de água deionizada. A seguir, o extrato já solubilizado foi aplicado no cartucho e lavado com 10 mL de água deionizada e eluído com 10 mL de soluções de metanol e água nas proporções 10:90; 30:70; 50:50; 70:30; 100:0, respectivamente e por fim o cartucho foi eluído com 10 mL de Acetato de Etila (AcOEt), restando ao fim 06 frações de SPE (Esquema 1).

As frações coletadas foram evaporadas até eliminação do solvente, solubilizadas e filtradas através de um filtro de membrana de 0,45 µm. Uma parte de cada fração foi injetada em UPLC-ESI-qTOF-MS² e outra foi conduzida para realização do teste de viabilidade celular com a espécie *L. amazonensis*.

4.4 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC)

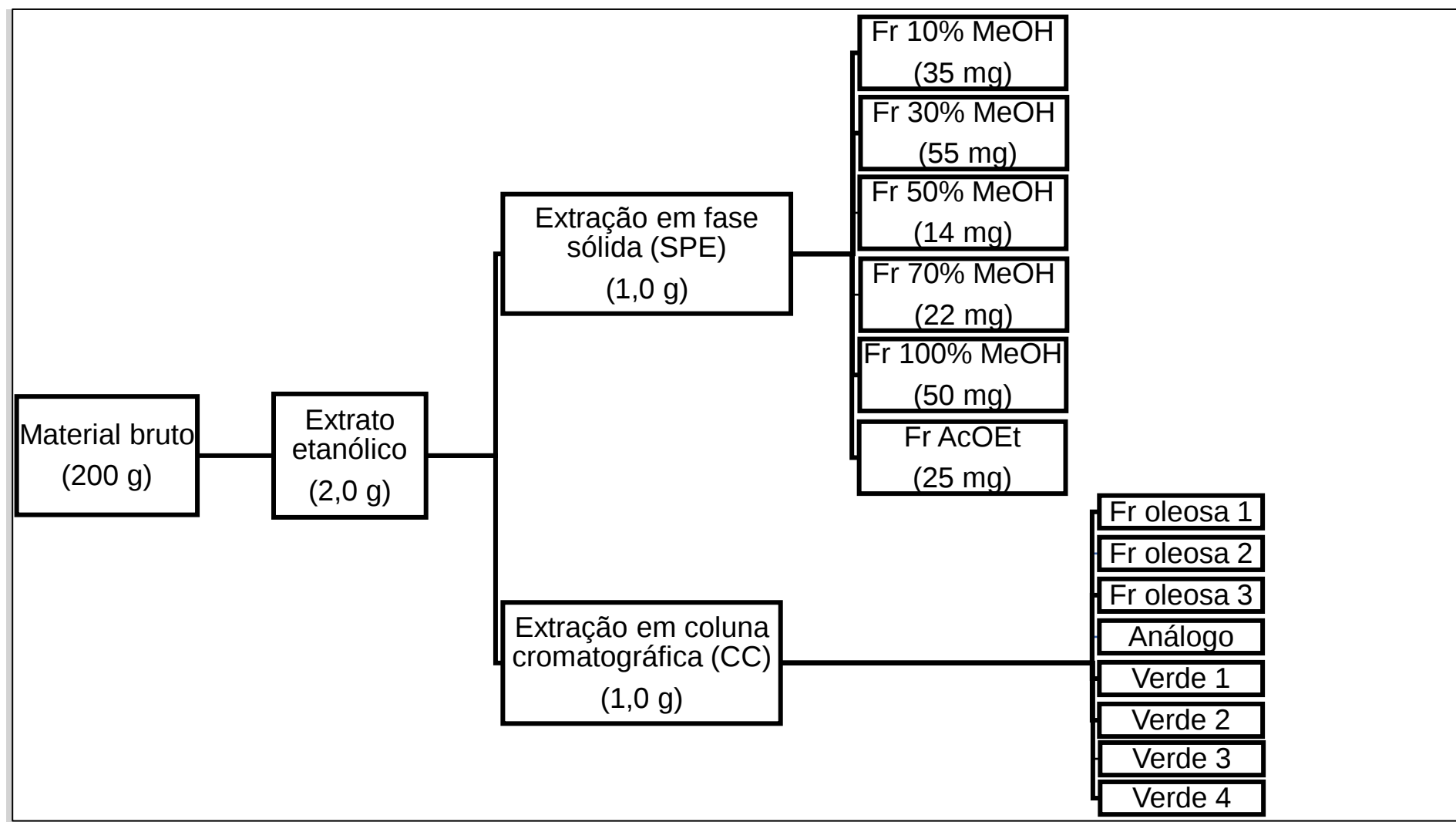
O extrato bruto etanólico de *Caulerpa racemosa* foi submetido a cromatografia de adsorção em coluna aberta (CC), utilizando sílica gel da Merck (Ø µm 63-200) usada como fase estacionária e seguindo a metodologia descrita por LIRA (2013) com algumas modificações. Os eluentes foram os solventes hexano e clorofórmio, com a seguinte ordem de eluição e proporção: hexano puro; hexano:clorofórmio (1:1); hexano:clorofórmio (8:2) e clorofórmio puro.

As frações foram coletadas de acordo com a eluição, sendo deixado cerca de 3 mL por recipiente, a seguir foram concentradas em evaporador rotativo e reunidas de acordo com o seu perfil cromatográfico comparado ao perfil do padrão da caulerpina após Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) e análise em lâmpada ultravioleta. Ao fim do procedimento obteve-se oito frações (Esquema 1). O análogo da caulerpina foi obtido na quarta fração, coletada como um pó de cor vermelha intensa e brilhante, o qual após seco foi

submetido a análise de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) para confirmação de sua estrutura molecular.

Esta etapa da cromatografia foi realizada com colaboração do aluno Vinicius Antônio Barbosa Gonçalves sob orientação da Profa. Dr. Bárbara Viviana de Oliveira Santos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/UFPB - Campus I.

Todas as frações foram preparadas para serem injetadas no UPLC-ESI-qTOF-MS² para análise dos constituintes químicos.

Esquema 1. Etapas de extração da *Caulerpa racemosa*

4.5 ATIVIDADE LEISHMANICIDA

4.5.1 Biossegurança

Todos os procedimentos experimentais foram realizados utilizando-se equipamentos de proteção individual (EPIs) adequados (cabine de segurança biológica classe II, jalecos, luvas, máscaras) e seguindo normas de boas práticas laboratoriais. Os materiais utilizados foram tratados com solução de hipoclorito de sódio 1% e os resíduos gerados desprezados em descartes apropriados e recolhidos pela empresa responsável pela coleta de materiais contaminados da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Os procedimentos foram realizados no laboratório de Imunologia Celular e Molecular da UFCSPA com a colaboração do Prof. PhD. Pedro Roosevelt Torres Romão.

4.5.2 Cultura de formas promastigotas de *L. amazonensis*

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) foram mantidas a 26 °C em meio M199 suplementado com 40 mM de HEPES, 0,1 mM deadenina, 7,7 mM de hemina, biotina, 10% de SBF, 50 U/mL de penicilina e 50 µg/mL deestreptomicina (DAGNINO et al., 2015).

4.5.3 Atividade leishmanicida das frações de *C. racemosa* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*

Formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de crescimento (3×10^6 /poço) foram incubadas com M199 (controle) ou diferentes concentrações (1-50M) das frações de *C. racemosa* e após 48 horas de incubação a viabilidade foi determinada através de ensaio colorimétrico com 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT). Para os ensaios, as frações de *C. racemosa* foram diluídas sem PBS estéril e DMSO (concentração final menor que 0,05%). Anfoterina B a 1 µM foi utilizada como fármaco de referência (100% mortalidade) (MARTINS et al., 2018).

4.5.4 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. As variáveis paramétricas foram comparadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Bonferroni usando o Programa GraphPad Prism versão 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DAS FRAÇÕES OBTIDAS DE SPE POR UPLC-PDA-QTOF-MS^E

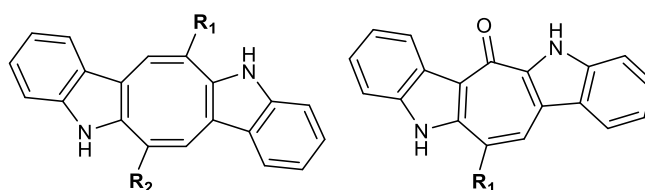
Dispondo dos dados de UPLC-DAD-qTOF-MS^E, foi possível a tentativa de identificação de cinco compostos nas frações de SPE (Tabela 1). Os compostos listados foram sugeridos baseando-se nos espectros de ultravioleta (UV), espectrometria de massas e em comparação com dados da literatura de substâncias identificadas anteriormente na *C. racemosa*, ou em outras espécies de mesmo Gênero. As análises do espectro de massas foram realizadas nos modos de ionização positivo e negativo, porém a visualização dos íons produtos foi mais bem observada em modo positivo. Isso pode ocorrer porque essas substâncias são sugeridas como alcaloides, os quais dispõem em sua estrutura química de pelo menos um nitrogênio, o que configura a essas substâncias caráter básico, sendo capaz de aceitar próton (H⁺) e apresentar melhor formação de íons produtos nos espectros obtidos por ESI em modo positivo. Nesses espectros observou-se íons produtos frequentes [M+H]⁺ e [M+Na]⁺. Através da análise dos espectros de UV foi possível observar, também, que as substâncias estão localizadas principalmente no tempo de retenção de 0 a 4 minutos com absorbância entre 221 nm a 348 nm.

Os dados mostrados nas Tabelas de 1 a 6 foram reunidos de forma agrupada, baseada nas classes de substâncias encontradas nas frações. Nas Figuras de 4 a 15 encontram-se os cromatogramas de absorção no ultravioleta (UV) e os cromatogramas do íon pico base obtidos para todas as frações SPE.

Todos os compostos descritos nas Tabelas 1 a 6 são metabólitos secundários da alga *Caulerpa racemosa*, entre essas substâncias encontram-se os alcaloides, especificamente do grupo dos que possuem anel indólico, com as análises dos espectros de massas, identificaram-se: ácido caulerpínico (**1**), monometil caulerpinato (**2**), caulerpina (**3**), etil metil caulerpinato (**11**) e caulersina (**16**). Os compostos de 1 a 4 apresentam em comum o esqueleto constituído de um anel central com oito carbonos, este anel está ligado a dois anéis indólicos. A substância 5 tem esqueleto básico semelhante aos compostos 1, 2, 3 e 4, com variação, apenas, no anel central, o qual possui uma carbonila (C=O) num anel de sete membros. As principais diferenças estruturais entre esses alcaloides são os

substituintes que se ligam no anel principal, com variação dos grupos: ácido carboxílico e éster (metílico ou etílico). Na figura 3 encontra-se a estrutura do esqueleto básico e as possíveis variações dos substituintes químicos para os alcaloides.

Figura 3. Possíveis alcaloides identificados nas frações obtidas por SPE da *C. racemosa*



R_1 e R_2 = COOH

Ácido caulerpínico

R_1 = COOH R_2 = CHO₂CH₃

Monometil caulerpinato

R_1 e R_2 = CHO₂CH₃

Caulerpina

R_1 = CHO₂C₂H₅ R_2 = CHO₂CH₃

Etil metil caulerpinato

R_1 = CHO₂CH₃

Caulersina

Figura 4. Cromatogramas UPLC-DAD (254, 314, 400 nm) e íon pico base (BPI) da fração MeOH (10%) da *C. racemosa* obtidos por UPLC-*q*TOF-MS^E em modo positivo

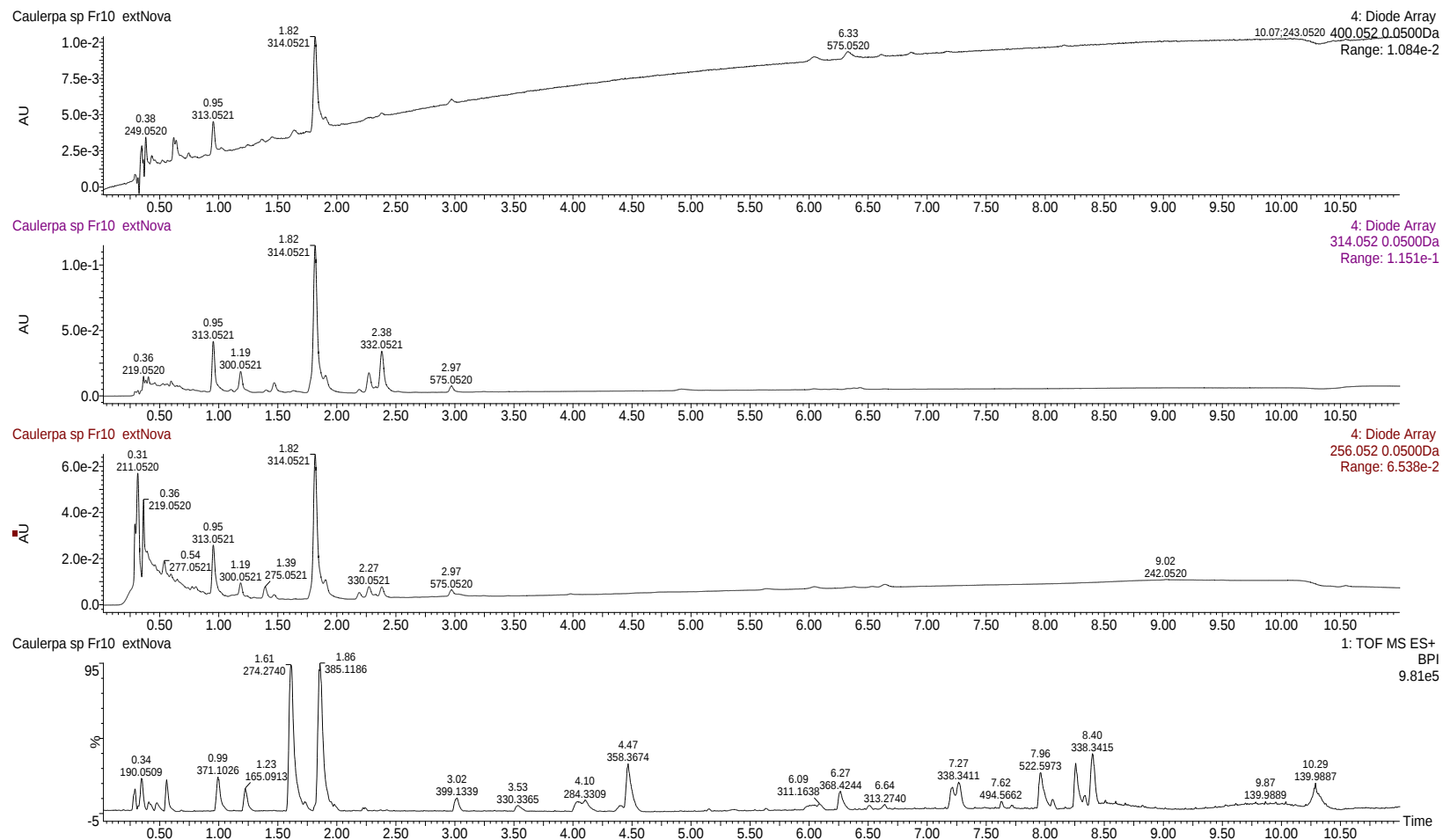


Figura 5. Cromatograma do íon pico base para a fração de SPE MeOH (10%) da *C. racemosa* obtido por UPLC-*q*TOF-MS^E em modo positivo

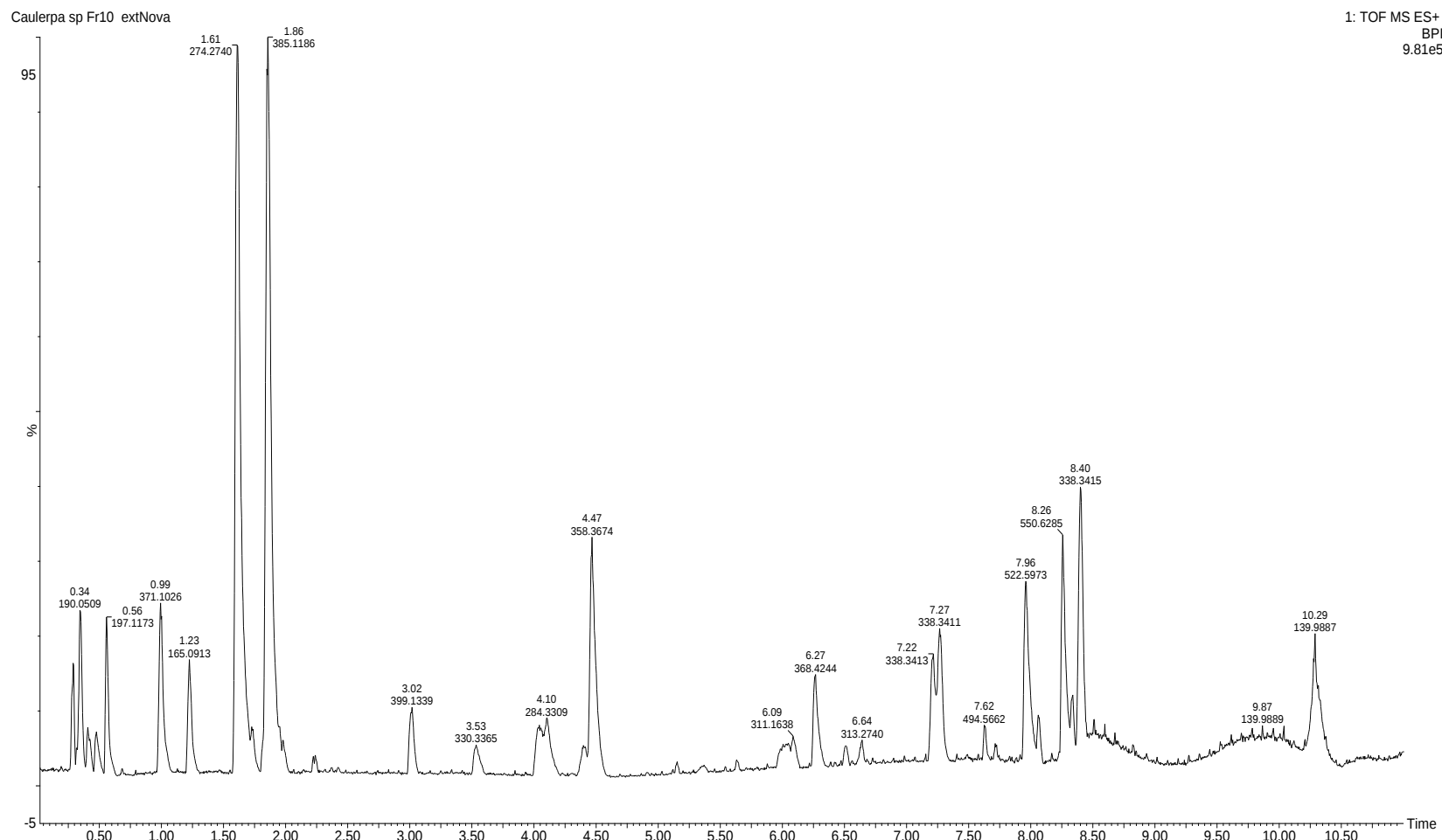


Tabela 1. Caracterização dos compostos da alga *C. racemosa* SPE Fr MeOH (10%) por UPLC-*q*TOF-MS^E

Comp.	TR (Min)	UV λ_{max} (nm)	[M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)		[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)		MS/MS	Identificação
			encontrada	calculada	encontrada	calculada		
1	0,99	348	371,1026	371,1026	369,0882	369,0880	327,1128 [M+H-CO ₂] ⁺ , [M+H-2xCO ₂] ⁺ 281,1063	ácido caulerpínico
2	1,86	314	385,1186	385,1182	383,1035	383,1037	341,1285 [M+H-CO ₂] ⁺ , [M+H-CO ₂ -CH ₃ OH] ⁺ , [M+H-CO ₂ -HCO ₂ CH ₃] ⁺ 281,1060	monometil caulerpinato
3	3,02	314	399,1339	399,1339	***	***	367,1084 [M+H-CH ₃ OH] ⁺ , 340,1211 [M+H-HCO ₂ CH ₃] ⁺ , 308,0942 [M+H-HCO ₂ CH ₃ - CH ₃ OH] ⁺ , 279,0914 [M+H- 2xHCO ₂ CH ₃] ⁺	caulerpina
4	3,54	268	330,3367	***	***	***	***	N.I
5	4,06	265	284,3310	***	***	***	***	N.I
6	4,47	268	358,3679	***	***	***	***	N.I

*** Não foi possível a visualização de íon produto e/ou pico do íon base para esse modo de ionização

Figura 6. Cromatograma UPLC-DAD (256, 314, 400 nm) e íon pico base (BPI) da fração MeOH (30%) da *C. racemosa* obtido por UPLC-*q*TOF-MS^E em modo positivo

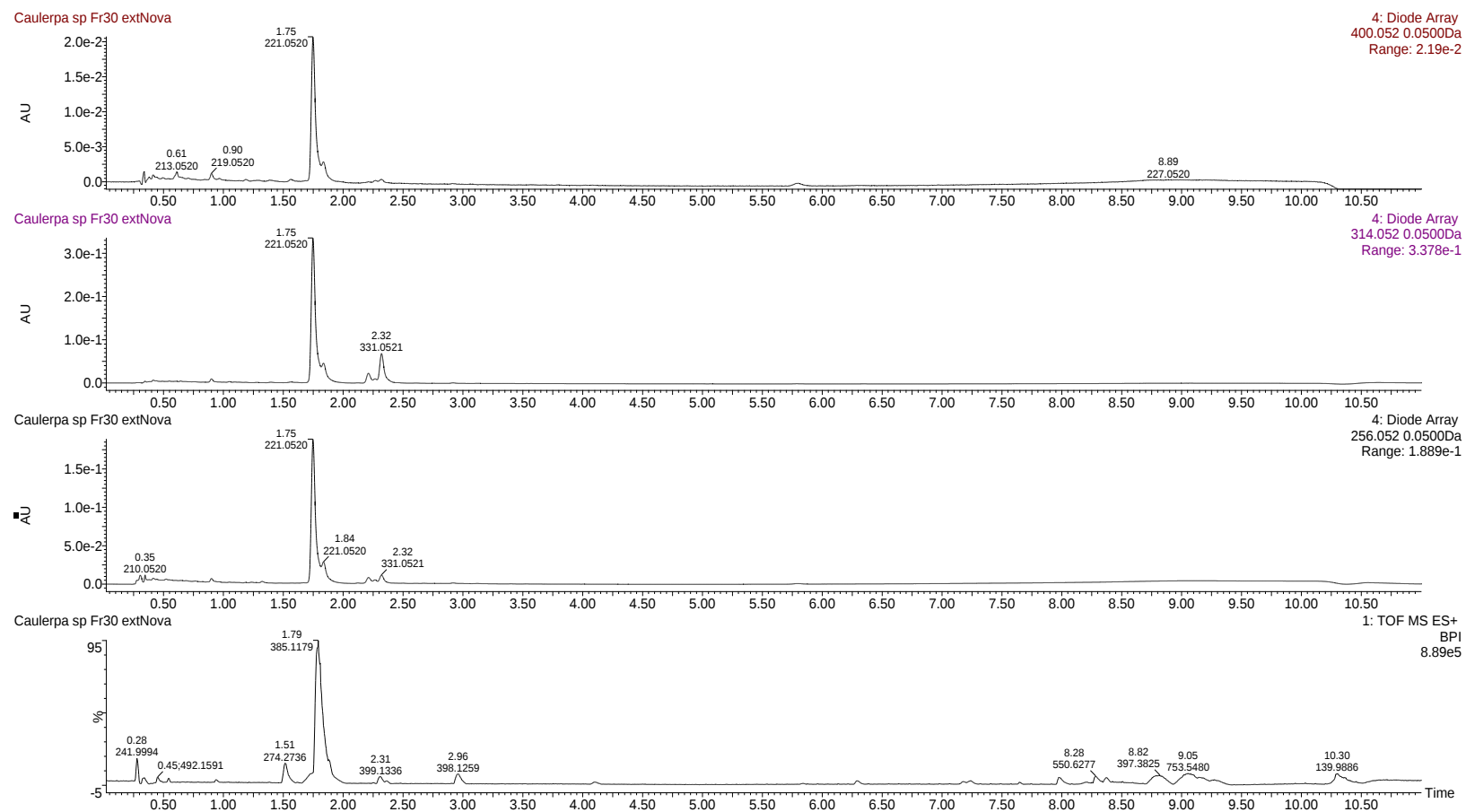


Figura 7. Cromatograma do íon pico base para a fração de SPE MeOH (30%) obtido por UPLC-*q*TOF-MS^E em modo positivo

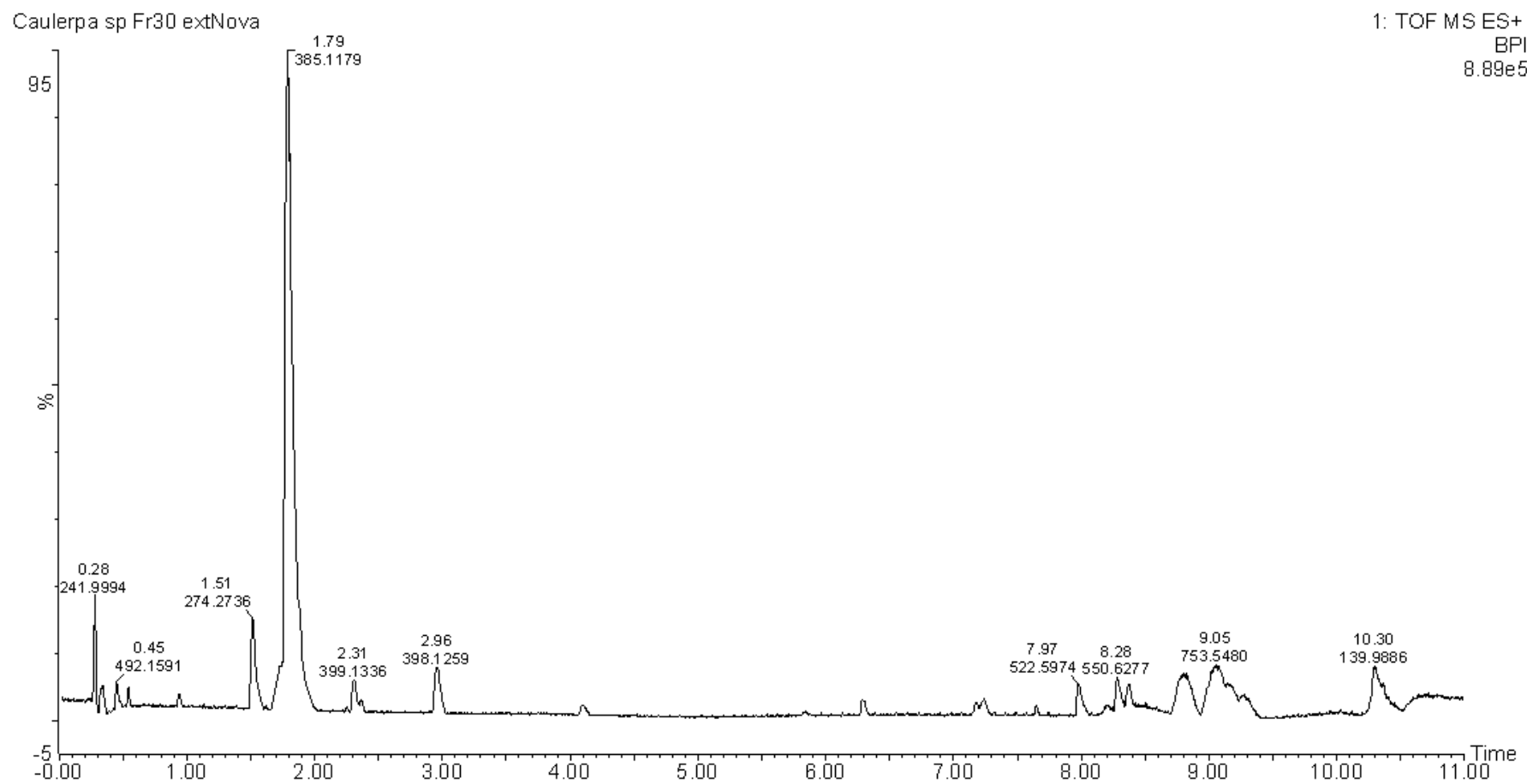


Tabela 2. Caracterização dos compostos da alga *C. racemosa* SPE Fr MeOH (30%) por UPLC-qTOF-MS^E

Comp.	TR (Min)	UV λ_{max} (nm)	[M+H] ⁺ (m/z)		[M-H] ⁻ (m/z)		MS/MS	Identificação
			encontrada	calculada	encontrada	calculada		
1	0,95	352	371,1025	371,1026	369,0886	369,0880	327,1130 [M+H-CO ₂] ⁺ , 281,1069 [M+H-2xCO ₂] ⁺	ácido caulerpínico
2	1,79	314	385,1182	385,1182	383,1033	383,1037	341,1273 [M+H-CO ₂] ⁺ , 281,1059 [M-H-CO ₂ -HCO ₂ CH ₃] ⁻	monometil caulerpinato
3	2,33	315	399,1339	399,1339	397,1193	397,1193	341,1279 [M+H-HCO ₂ CH ₃] ⁺ , 279,0913 [M+H-2xHCO ₂ CH ₃] ⁺	caulerpina

*** Não foi possível a visualização de íon produto e/ou pico do íon base para esse modo de ionização.

Figura 8. Cromatograma UPLC-DAD (256, 314, 400 nm) e ESI íon pico base (BPI) da fração MeOH (50%) da *C. racemosa* obtido por UPLC-*q*TOF-MS^E em modo positivo

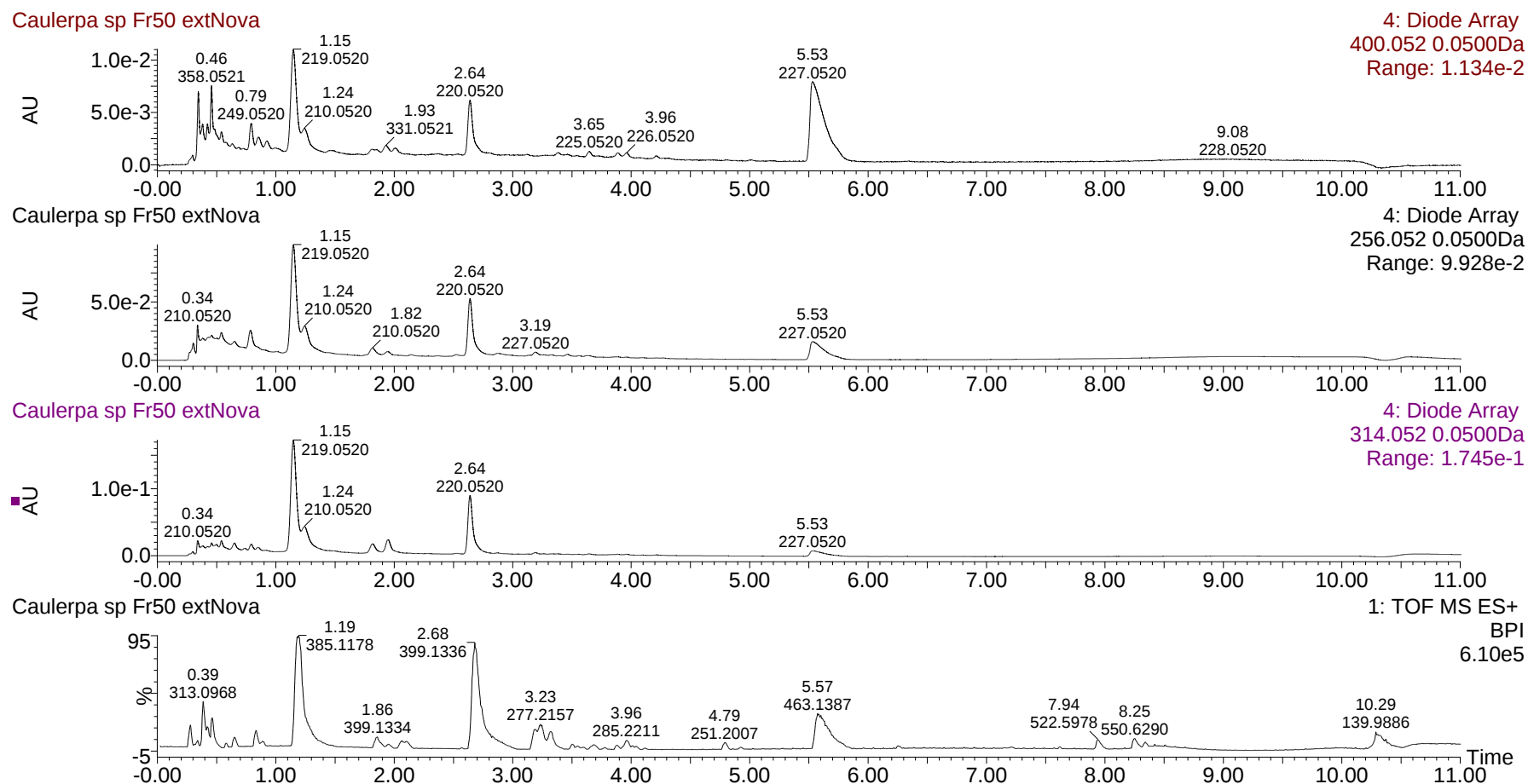


Figura 9. Cromatograma da fração de SPE MeOH (50%) e íon pico base obtido por UPLC-*q*TOF-MS^E em modo positivo

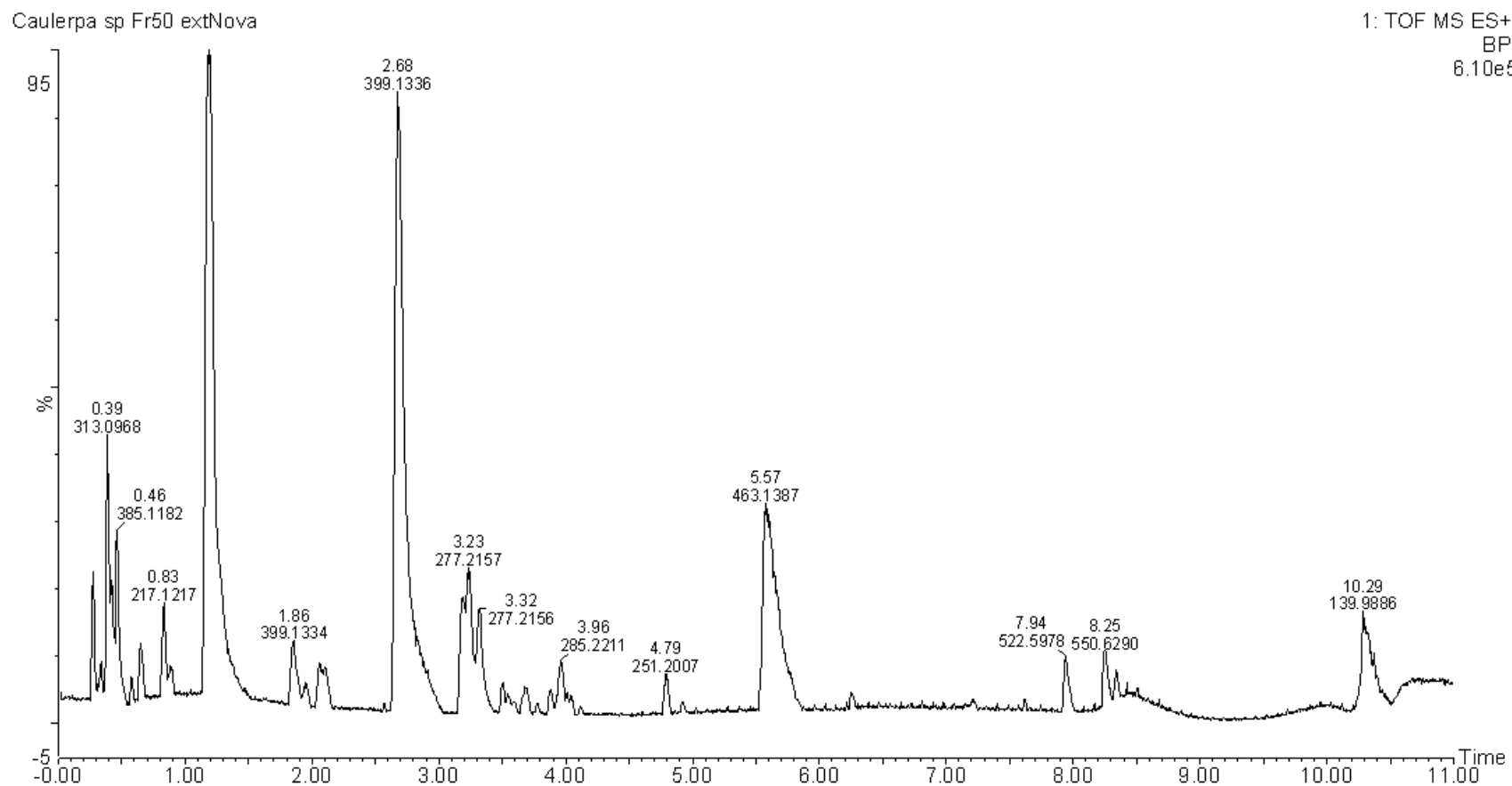


Tabela 3. Caracterização dos compostos da alga *C. racemosa* SPE Fr MeOH (50%) por UPLC-*q*TOF-MS^E

Comp.	TR (Min)	UV λ_{max} (nm)	[M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)		[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)		MS/MS	Identificação
			encontrada	calculada	encontrada	calculada		
2	1,19	314	385,1172	385,1182	383,1036	383,1037	341,1275 279,0907 HCO ₂ CH ₃] ⁺	[M+H-CO ₂] ⁺ , [M+H-CO ₂ - caulerpinato
7	1,96	330	249,1849	***	***	***	***	N.I
3	2,69	315	399,1337	399,1339	397,1194	397,1193	367,1080 340,1205 279,0916	[M+H-CH ₃ OH] ⁺ , [M+H-HCO ₂ CH ₃] ⁺ , [M+H-2xHCO ₂ CH ₃] ⁺ caulerpina
8	3,25	275	277,2161	***	***	***	***	N.I
9	3,95	227	285,2212	***	***	***	***	N.I
10	4,77	227	251,2005	***	***	***	***	N.I

*** Não foi possível a visualização de íon produto e/ou íon pico base para esse modo de ionização.

Figura 10. Cromatograma UPLC-DAD (252, 314 nm) e íon pico base (BPI) da fração MeOH (70%) da *C. racemosa* obtido UPLC-*q*TOF-MS^E em modo positivo

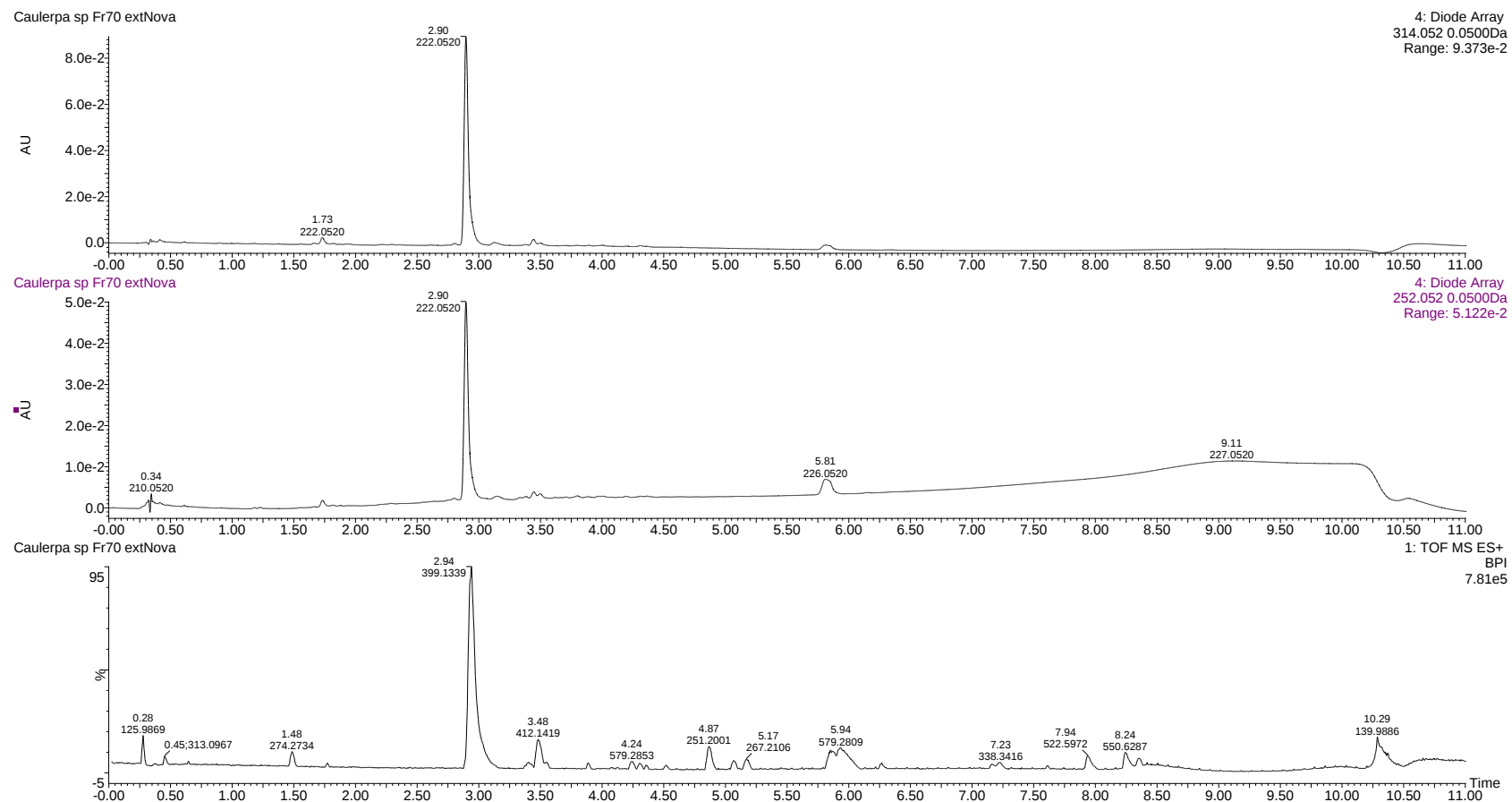


Figura 11. Cromatograma do íon pico base para a fração de SPE MeOH (70%) obtido por UPLC-*q*TOF-MS^E em modo positivo

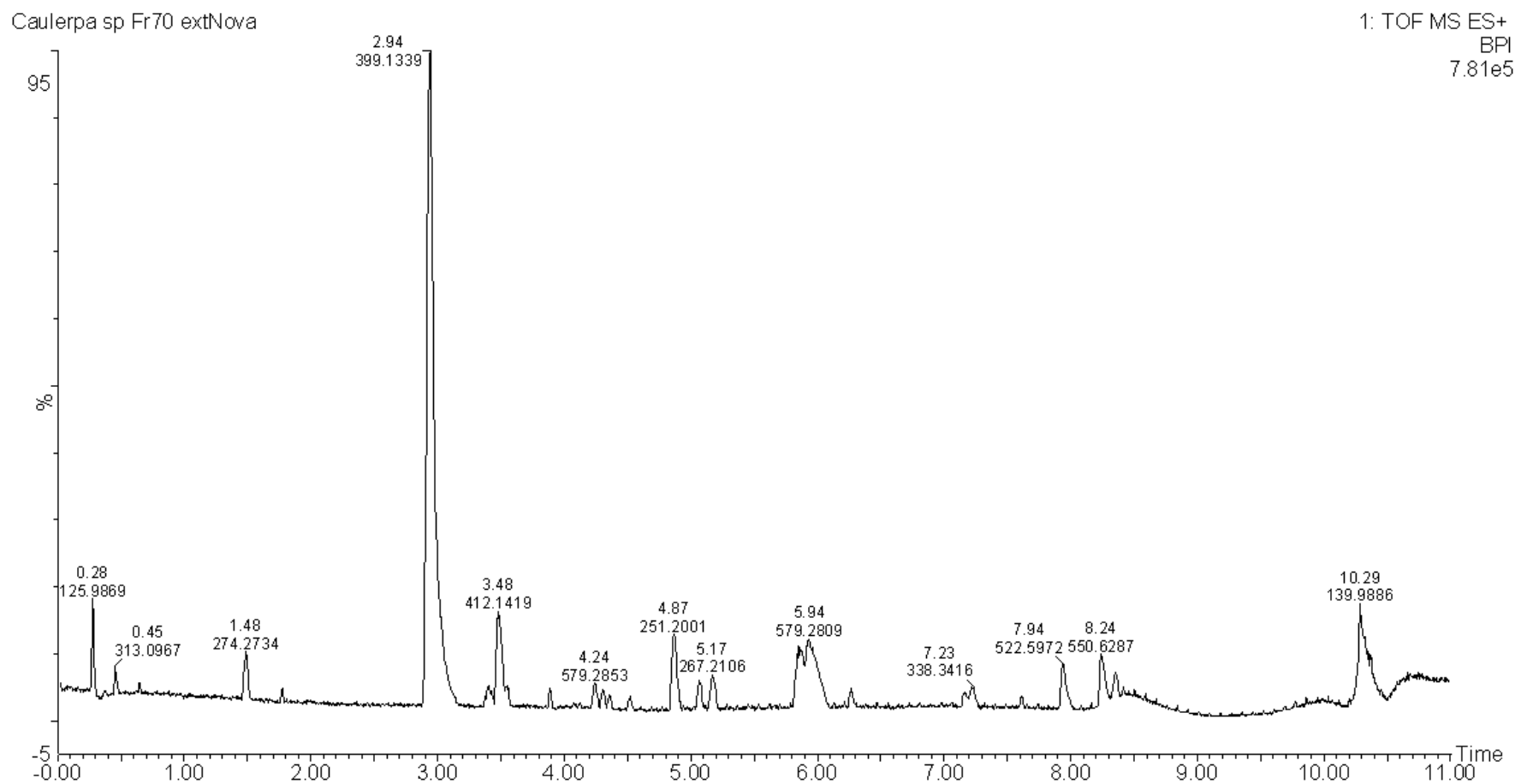


Tabela 4. Caracterização dos compostos da alga *C. racemosa* SPE Fr MeOH (70%) por UPLC-qTOF-MS^E

Comp.	TR (Min)	UV λ_{max} (nm)	[M+H] ⁺ (m/z)		[M-H] ⁻ (m/z)		MS/MS	Identificação
			encontrada	calculada	encontrada	calculada		
2	1,77	314	385,1181	385,1182	383,1033	383,1037	341,1295 [M+H-CO ₂] ⁺ , 327,1116 [M+H-HCO ₂ CH ₃] ⁺	monometil caulerpinato
3	2,95	315	399,1338	399,1339	397,1177	397,1193	367,1079 [M+H-CH ₃ OH] ⁺ , 340,1002 [M+H-HCO ₂ CH ₃] ⁺ , 279,0912 [M+H-2xHCO ₂ CH ₃] ⁺	caulerpina
11	3,47	315	413,1482	413,1495	***	***	380,1189 [M+H-CH ₃ OH] ⁺ , 367,1013 [M+H-C ₂ H ₆ OH] ⁺ , 341,1208 [M+H-HCO ₂ C ₂ H ₅] ⁺ , 307,0797 [M+H-HCO ₂ C ₂ H ₅ - CH ₃ OH] ⁺ , 279,0915 [M+H- HCO ₂ C ₂ H ₅ -HCO ₂ CH ₃] ⁺	etil metil caulerpinato
12	4,89	225	251,2002	***	***	***	***	N.I
13	5,17	225	267,2106	***	***	***	***	N.I
14	7,23	225	338,3417	***	***	***	***	N.I

*** Não foi possível a visualização de íon produto e/ou pico do íon base para esse modo de ionização.

Figura 12. Cromatograma UPLC-DAD (257, 314, 400 nm) e íon pico base (BPI) da fração MeOH (100%) da *C. racemosa* obtido por UPLC-qTOF/MS^E em modo positivo

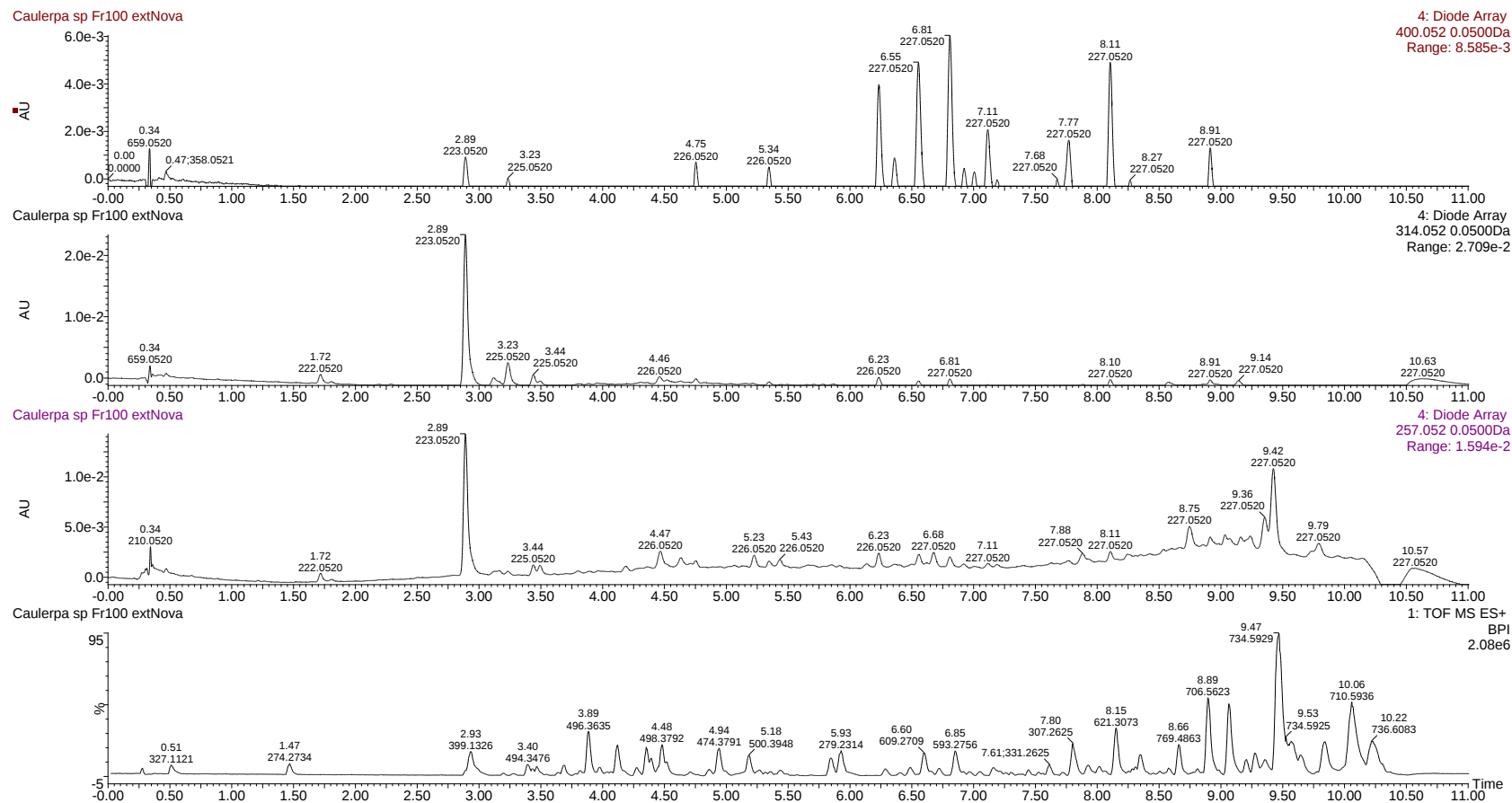


Figura 13. Cromatograma do íon pico base para a fração de SPE MeOH (100%) obtido por UPLC-*q*TOF-MS^E em modo positivo

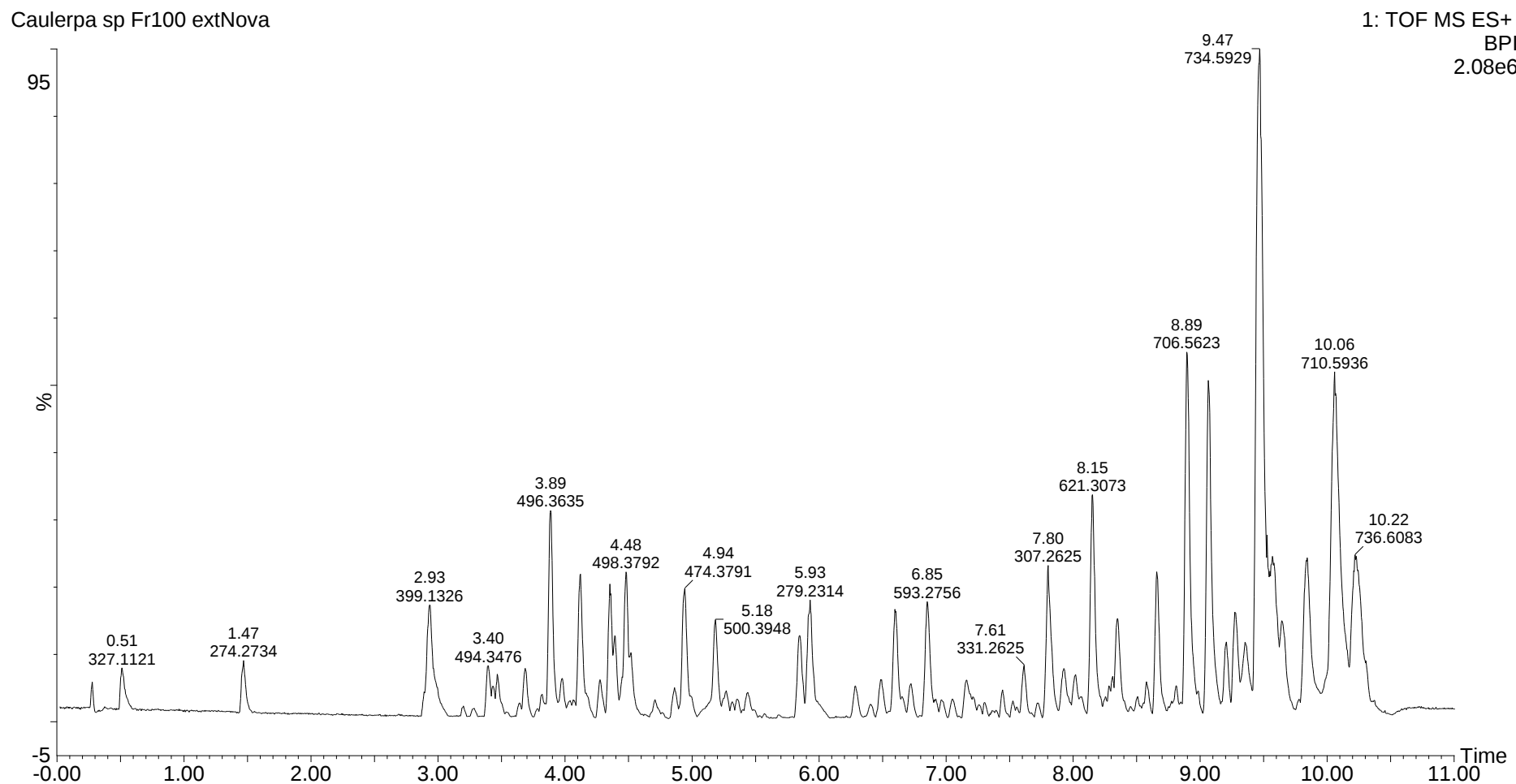


Tabela 5. Caracterização dos compostos da alga *C. racemosa* SPE Fr MeOH (100%) por UPLC-*q*TOF-MS^E

Comp.	TR (Min)	UV λ_{max} (nm)	[M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)		[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)		MS/MS	Identificação
			encontrada	calculada	encontrada	calculada		
15	0,51	357	327,1125	***	***	***	***	N.I
3	2,93	318	399,1326	399,1339	***	***	367,1073 [M+H-CH ₃ OH] ⁺ , 340,1200 [M+H-HCO ₂ CH ₃] ⁺ , 279,0908 [M+H-2xHCO ₂ CH ₃] ⁺	caulerpina
16	3,28	315	343,1078	343,1077	***	***	311,0822 [M+H-CH ₃ OH] ⁺ , 285,0865 [M+H-HCO ₂ CH ₃] ⁺ , 255,0915 [M+H-HCO ₂ CH ₃ -CO] ⁺	caulersina
17	4,87	227	251,2002	***	***	***	***	N.I
18	5,93	227	279,2314	***	***	***	***	N.I
19	8,89	227	706,5623	***	***	***	***	N.I
20	9,47	227	710,5936	***	***	***	***	N.I

*** Não foi possível a visualização de íon produto e/ou pico do íon base para esse modo de ionização.

Figura 14. Cromatograma UPLC-DAD (257 nm) e ESI íon pico base (BPI) da fração AcOEt da *C. racemosa* obtido por UPLC-qTOF/MS^E em modo positivo

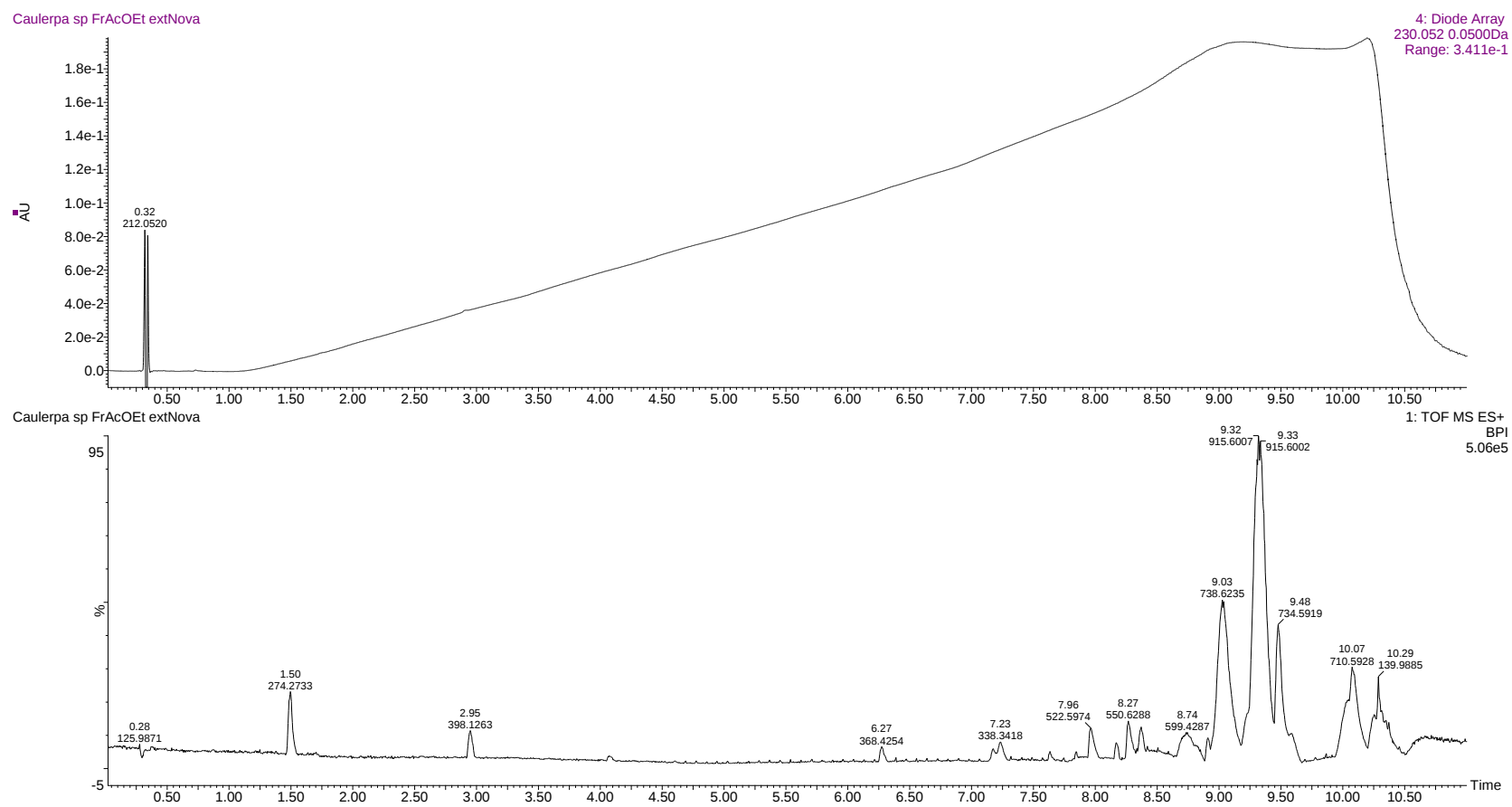


Figura 15. Cromatograma da fração de SPE AcOEt do íon pico base obtido por UPLC-*q*TOF-MS^E em modo positivo

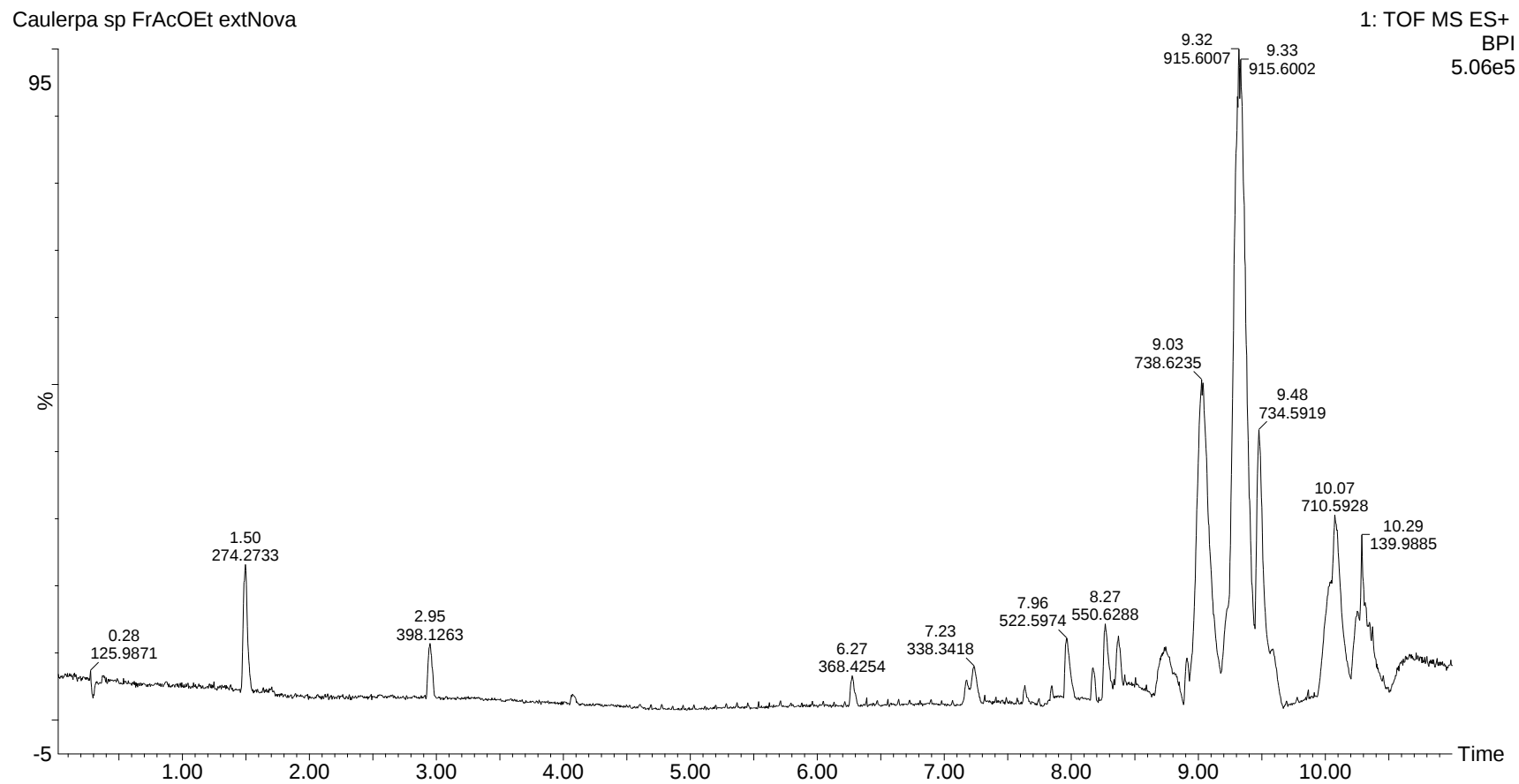


Tabela 6. Caracterização dos compostos da alga *C. racemosa* SPE Fr AcOEt por UPLC-*q*TOF-MS^E

Comp.	TR (Min)	UV λ_{max} (nm)	[M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)		[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)		MS/MS	Identificação
			encontrada	calculada	encontrada	calculada		
3	2,96	314	398,1266	398,1267	***	***	367,1064 [M+H-CH ₃ OH] ⁺ , 338,1060 [M+H-HCO ₂ CH ₃] ⁺ ,	caulerpina
21	6,27	227	368,4254	***	***	***	***	N.I
22	7,24	227	384,3475	***	***	***	***	N.I
23	9,03	227	738,6235	***	***	***	***	N.I
24	9,27	227	915,5997	915,5957	***	***	751,5330 [M+H-C ₆ H ₁₂ O ₆] ⁺ , 551,5039 [M+H-C ₆ H ₁₂ O ₆ - C ₁₄ H ₂₂] ⁺	fosfolípido glicosilado
25	9.48	227	734,5916	***	***	***	***	N.I
26	10.07	227	710,5927	***	***	***	***	N.I

*** Não foi possível a visualização de íon produto e/ou pico do íon base para esse modo de ionização.

Baseado nas análises dos cromatogramas de UV, em que há a correlação direta entre a intensidade dos picos e a concentração das substâncias nas amostras, verifica-se que o ácido caulerpínico (1) encontra-se quase majoritariamente na Fr 10% MeOH, menos concentrado na Fr 30% MeOH e ausente nas outras frações. O monometil caulerpinato (2), por sua vez, é comum em todas as frações, exceto na Fr AcOEt, porém aparece em maiores proporções nas frações de 10, 30 e 50 (%) MeOH e em menores concentrações nas frações 70 e 100 (%) MeOH. A caulerpina (3) está presente em todas as frações, contudo em maiores concentrações na Fr 70% MeOH, seguida da Fr 100% MeOH. Isso pode ocorrer porque a caulerpina é um dos metabólitos mais abundante da *C. racemosa* e de outras algas do Gênero *Caulerpa* (VEST et al., 1983). Esses compostos citados acima têm incidência em mais de uma fração, com exceção do composto etil metil caulerpinato que ocorre apenas na Fr 70% MeOH e a caulersina que ocorre somente na Fr 100% MeOH. Essa diferença na concentração das substâncias em frações diferentes pode ser explicada pelo gradiente de eluição realizado durante o fracionamento de SPE. Onde as primeiras frações (10 e 30%) tem maior quantidade de água e menor concentração do solvente orgânico (MeOH) atraindo os componentes mais polares, neste caso o **1**, nas frações 30 e 50 % MeOH observa-se a retenção de componentes com polaridade intermediária o **2**, seguindo gradativamente os mais apolares **3**, **11** e **16** nas frações que tem maior concentração ou totalidade de solvente orgânico do que de água, as frações de 70 e 100 % MeOH. Nas figuras de 3 a 7 encontram-se os espectros de UV, massas e propostas de formação dos íons produtos para cada alcaloide identificado, incluindo o novo alcaloide que também foi avaliado posteriormente pelas técnicas de Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de H^1 e C^{13} .

5.1.1 Alcaloides por UPLC-DAD-qTOF-MS^E

O alcaloide **1** está presente nas frações SPE 10 e 30 (%) MeOH com pico do íon protonado em m/z 371,1026 $[M+H]^+$, com absorção máxima em UV de 348 nm, mas em estudo anterior o UV máximo para **1** tinha sido reportado em 309 nm (ANJANEYULU et al., 1991). Os íons produtos observados para o pico **1** tem m/z 327,1128 $[M+H-CO_2]^+$ e m/z 281,1063 $[M+H-2xCO_2]^+$, os quais correspondem a perda de uma ou duas moléculas neutras (44 Da) de dióxido de carbono,

respectivamente. A perda de uma molécula neutra de CO_2 é comum em compostos que possuem o grupo ($-\text{CO}_2\text{H}$) em sua estrutura molecular. Em estudos anteriores, o composto com peso molecular de 370 Da pode ser obtido através da hidrólise alcalina da caulerpina, como um pó de cor marrom escuro, sendo reportado na espécie *C. racemosa*, como também nas espécies *C. sertularioides* e *C. mexicana* (ORNANO et al., 2014; LIU et al., 2012; ANJANEYULU et al., 1991). Por esses dados observados em comparação com a literatura, sugere-se que o pico 1 seja o ácido caulerpínico. Os espectros de UV, massas e proposta de formação dos íons produtos do ácido caulerpínico está na Figura 16.

O pico 2 ($\lambda_{\text{máx}} = 314 \text{ nm}$) exibiu íon molecular protonado em m/z 385,1182 $[\text{M}+\text{H}]^+$, semelhante ao alcaloide 1 tem perda isolada de dióxido de carbono que corresponde ao íon produto m/z 341,1285 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2]^+$, porém tem perdas neutras não observadas no 1, m/z 309,1014 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2-\text{CH}_3\text{OH}]^+$ e m/z 281,1060 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2-\text{HCO}_2\text{CH}_3]^+$ que indica saídas simultâneas de dióxido mais metanol e perdas simultâneas de dióxido de carbono e grupo de éster metílico, respectivamente. O pico 2 foi analisado em outros trabalhos com 384 Da, isolado como um pó de cor laranja amarelado e identificado em espécie de *C. racemosa* (LIU et al., 2012; NIELSEN et al., 1982; ANJANEYULU et al., 1991; VEST et al., 1983), por isso esse pico foi sugerido como sendo monometil caulerpinato. Os espectros de UV, massas e proposta de formação dos íons produtos do monometil caulerpinato está na Figura 17.

Todas as frações de SPE apresentou o pico 3, o qual mostrou íon molecular protonado em m/z 399,1339 $[\text{M}+\text{H}]^+$, com eliminações neutras de grupos éster metílico e metanol, assim como foi observado para o pico 2 gerando os íons m/z 367,1084 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{OH}]^+$ e m/z 340,1211 $[\text{M}+\text{H}-\text{HCO}_2\text{CH}_3]^+$, respectivamente. No entanto, as perdas simultâneas de ambos os grupos ou de duas unidades de éster metílico foi vista somente para o pico 3, as quais correspondem aos íons m/z 308,0942 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{OH}-\text{HCO}_2\text{CH}_3]^+$ e m/z 279,0914 $[\text{M}+\text{H}-2\text{xHCO}_2\text{CH}_3]^+$. Estes dados estão de acordo com a literatura a qual encontra-se íons produtos semelhantes em m/z 366 $[\text{M}-32]$, m/z 338 $[\text{M}-60]$, m/z 306 $[\text{M}-92]$ e m/z 274 $[\text{M}-124]$ (ANJANEYULU et al., 1991; CABRITA et al., 2010). Com esses dados, mais a absorção máxima do UV em 315 nm, e em comparação com a amostra padrão, foi possível confirmar que o pico 3 seja a caulerpina, o metabólito secundário da classe dos alcaloides mais abundante do Gênero *Caulerpa*. Sendo reportado em mais de

vinete espécies de *Caulerpa* , incluindo a *C. racemosa* (ORNANO et al., 2014; LIU et al., 2012; ANJANEYULU et al., 1991; MAO et al., 2006; ALARIF et al., 2010; CHENG et al., 2008; SOUSA, 2016). Os espectros de UV, massas e proposta de formação dos íons produtos do caulerpina está na Figura 18.

Figura 16. Espectros de UV, massas e proposta de formação dos íons produtos do ácido caulerpínico

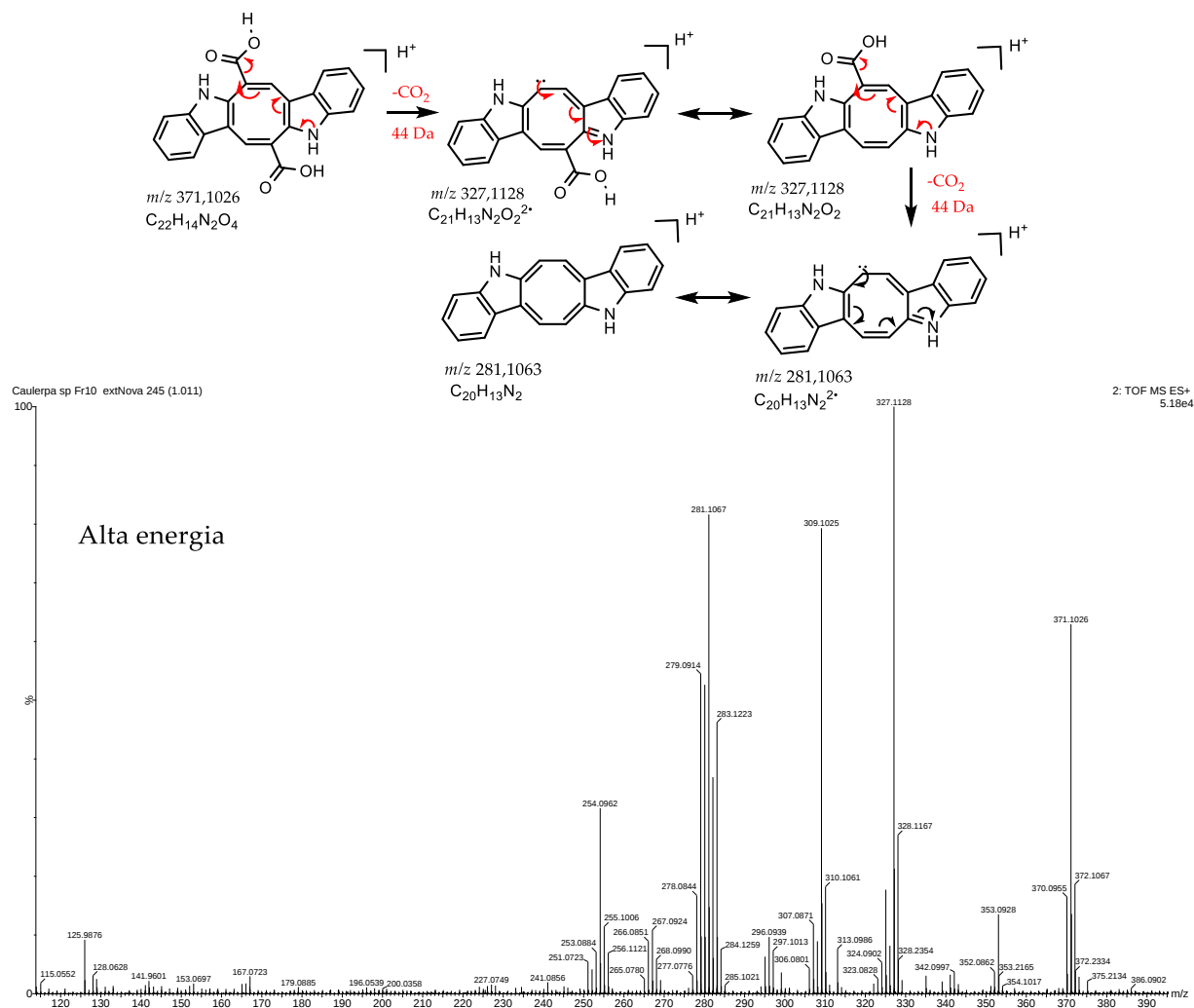


Figura 17. Espectros de UV, massas e proposta de formação dos íons produtos do monometil caulerpinato

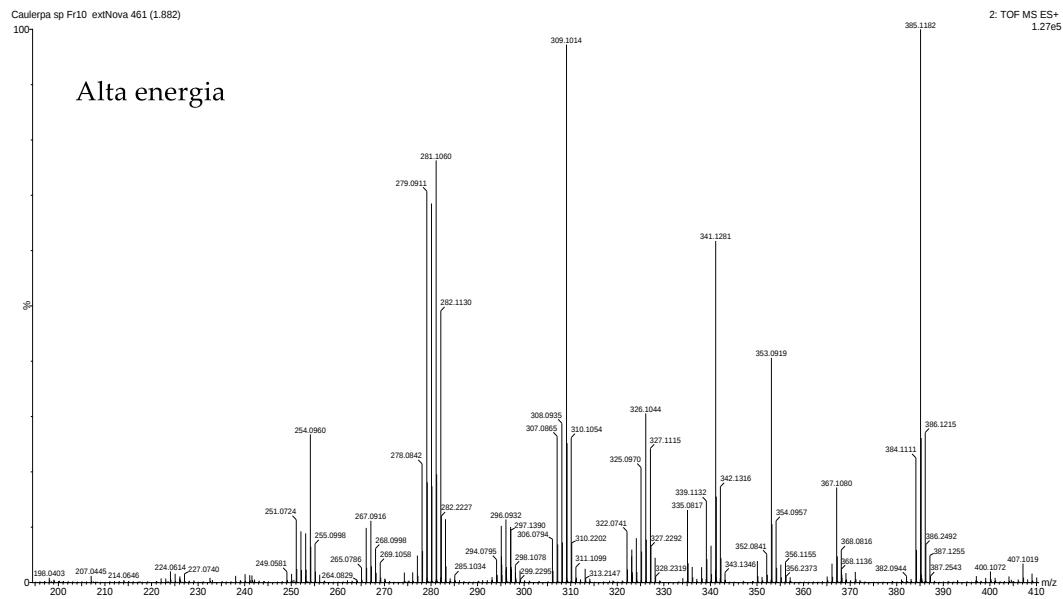
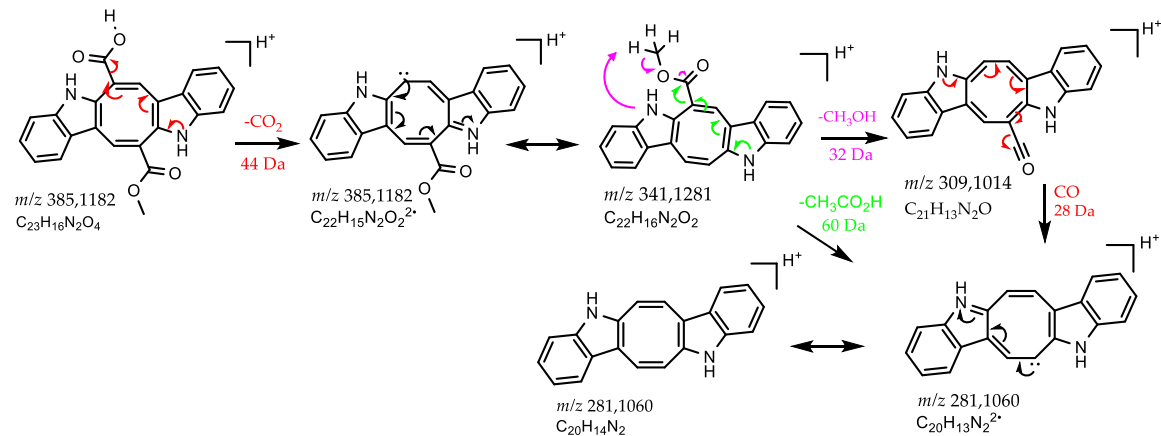
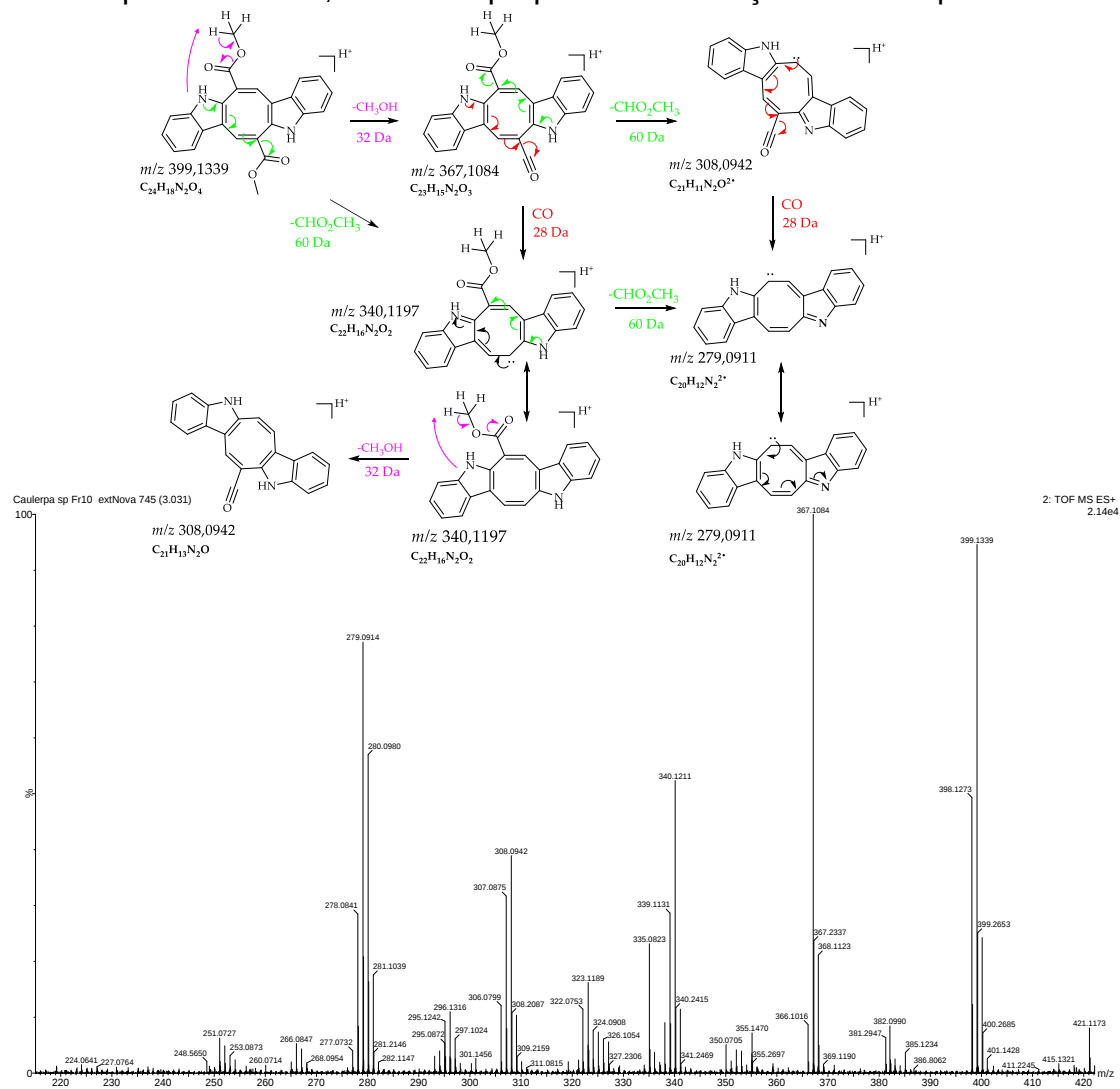


Figura 18. Espectros de UV, massas e proposta de formação dos íons produtos da caulerpina



Por fim, o pico **16** que está presente apenas na Fr 100% MeOH apresentou íon molecular protonado em m/z 343,1078 $[M+H]^+$, com absorção máxima de UV em 315 nm, dados de UV semelhante foi reportado em estudo anterior (SU et al., 1997). As perdas de moléculas neutras de forma isolada é similar aos picos **2** e **3** gerando os íons em m/z 285,2207 $[M+H-HCO_2CH_3]^+$ e 311,0822 $[M+H-CH_3OH]^+$. A diferença desse para os outros é a eliminação simultânea de monóxido de carbono e éster etílico com íon produto em m/z 255,0915 $[M+H-HCO_2CH_3-CO]^+$ que formam um núcleo básico distinto dos anteriores, para este pico o anel central tem apenas seis membros. De acordo com os dados supracitados, e em comparação com a literatura, sugere-se o pico 5 como caulersina, a qual foi isolada em espécie de *C. racemosa* e *C. serrulata* (LIU et al., 2012; SU et al., 1997; YANG et al., 2014). Os espectros de UV, massas e proposta de formação dos íons produtos do caulersina está na Figura 19.

5.1.2 Espectro de massas do etil metil caulerpinato

Nos espectros de massas, o pico **11** foi observado apenas na fração de SPE 70% MeOH, com íon molecular protonado em m/z 413,1482 $[M+H]^+$ e absorção máxima de UV em 315 nm (Tabela 1), semelhante aos compostos 2, 3 e 4 apresenta eliminação de forma isolada de molécula neutra de metanol com íon produto em m/z 380,1189 $[M+H-CH_3OH]^+$. Todavia, dentre todos os compostos avaliados, somente o 5 apresentou saída dos grupos etanol e éster etílico de forma isolada, as quais correspondem aos íons produtos m/z 367,1013 $[M+H-C_2H_5OH]^+$ e m/z 341,1208 $[M+H-HCO_2C_2H_5]^+$, respectivamente. Além disso, diferencia-se dos demais por perda simultânea de metanol e éster etílico, os quais correspondem ao íon produto em m/z 307,0797 $[M+H-CH_3OH-HCO_2C_2H_5]^+$ e a eliminação em conjunto dos grupos de éster (metílico e etílico) com m/z 279,0915 $[M+H-HCO_2CH_3-HCO_2C_2H_5]^+$. Em comparação com o padrão da caulerpina, a qual foi injetada sob mesmas condições, observa-se adição em massa de 14 Da que pode corresponder ao grupo CH_2 , tal sugestão de incremento na massa molecular pode ser apoiado pelo íons produtos visualizados em m/z 367,1013 $[M+H-C_2H_5OH]^+$ e m/z 341,1208

$[M+H-HCO_2C_2H_5]^+$, tendo em vista que os mesmos íons são observados para a caulerpina, porém com ausência de 14 Da.. O espectro de massas e a proposta de fragmentação dos íons produtos está na Figura 20.

Contudo, dispondo apenas dos dados de espectro de massas, não é possível a confirmação da real estrutura molecular desse composto, a fim de confirmar tal hipótese foi realizada as etapas para isolamento do composto e posterior análises espectroscópicas.

Figura 19. Espectros de UV, massas e proposta de formação dos íons produtos da caulersina

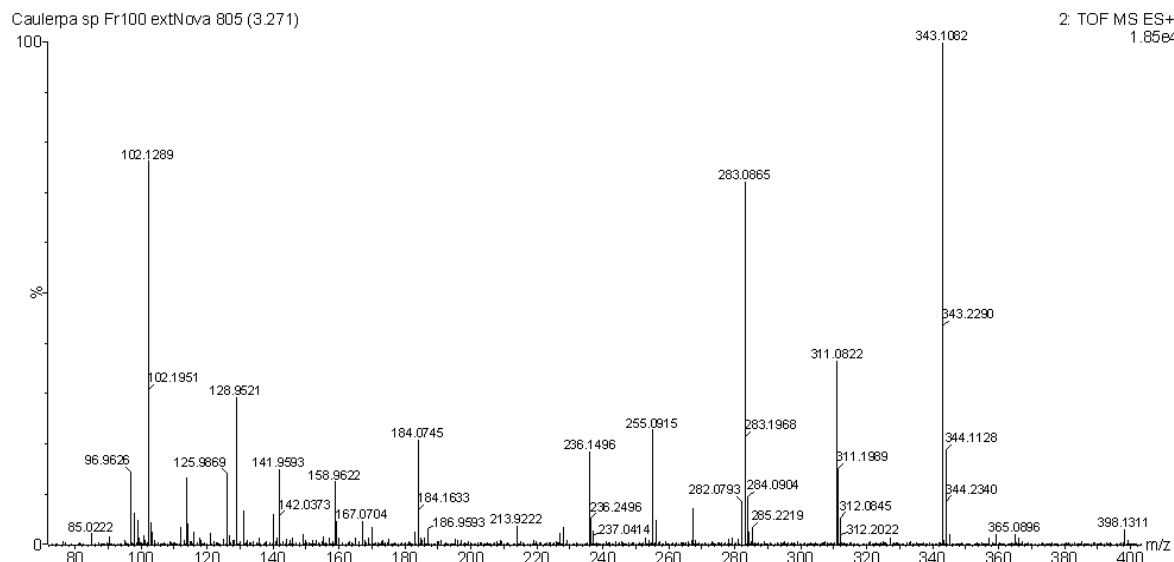
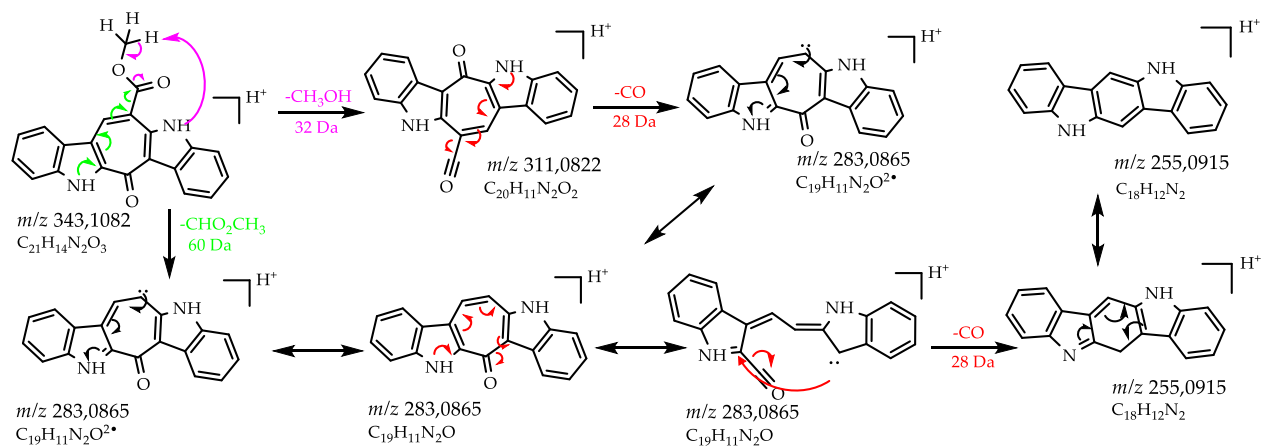
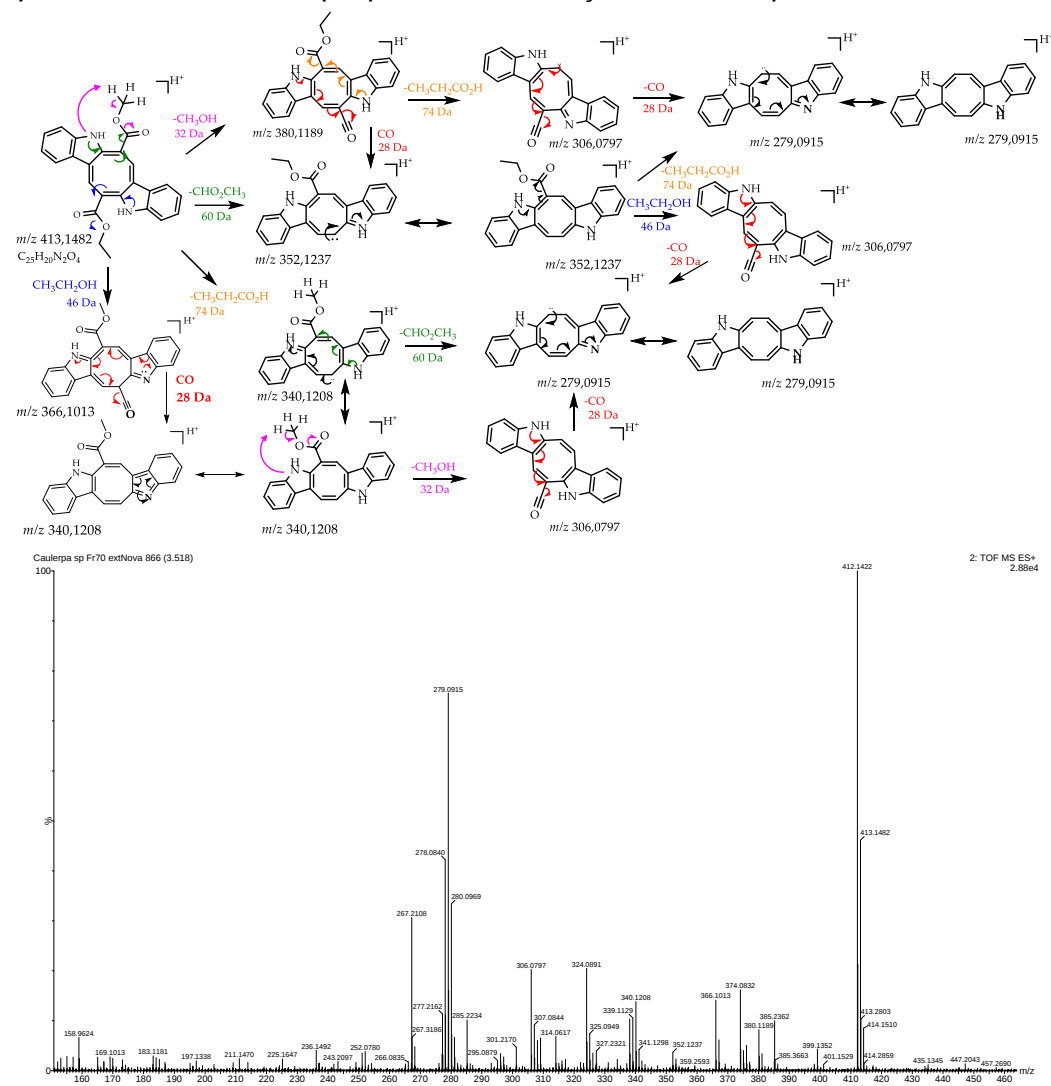


Figura 20. Espectros de massas e proposta de formação dos íons produtos do etil metil caulerpinato

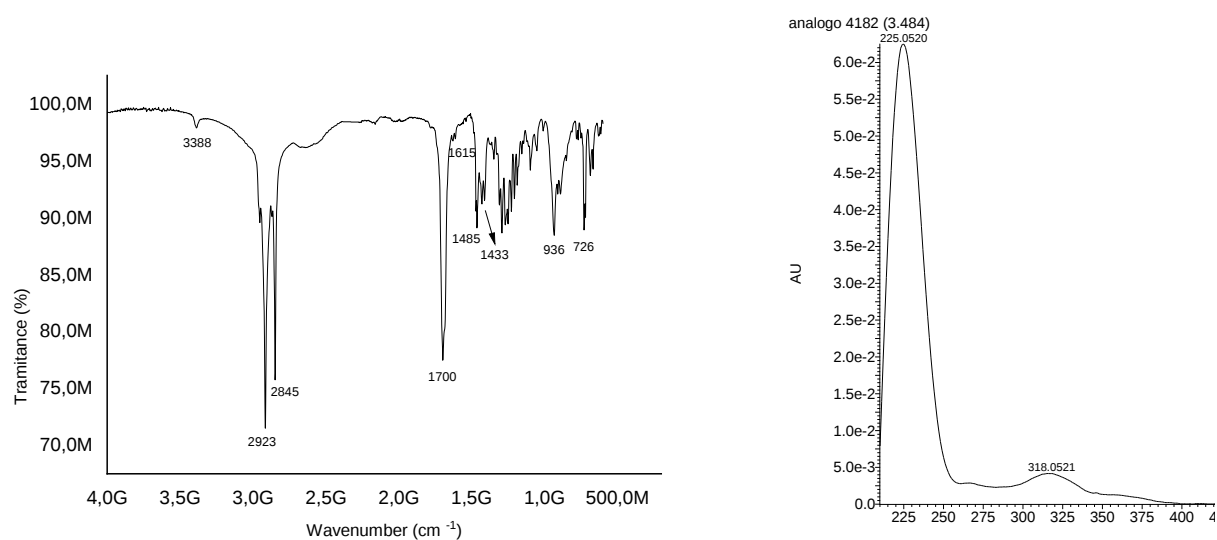


5.2 ESPECTROS DE ULTRAVIOLETA, INFRAVERMELHO, RMN DE ^1H E RMN DE ^{13}C DO ETIL METIL CAULERPINATO

Com o auxílio dos espectros de absorção na região do UV, IV, RMN de ^1H e ^{13}C mono e bidimensionais foi possível a identificação do etil metil caulerpinato. A estrutura proposta do novo alcaloide bis-indólico mostrou absorção no UV de 225, 265 e 318 nm (Figura 21), o que sugere a presença da carbonila funcional em conjugação com sistema de anéis aromáticos. Os nitrogênios do alcaloide bis-indólico têm dois elétrons desemparelhados, os quais também participam da ressonância com os elétrons (π) dos cinco anéis aromáticos conjugados.

No espectro de IV (Figura 21), observou-se a presença da absorção correspondente ao estiramento N-H em 3388 cm^{-1} , as bandas em 3388 e 1612 cm^{-1} podem ser responsáveis pelas frequências de alongamento e flexão do grupo N-H, respectivamente. Os sinais em 2923 e 2845 cm^{-1} são correspondentes aos estiramentos do tipo C-H de metoxila e etila. O caráter aromático pode ser indicado pelas bandas 1485 e 1433 cm^{-1} e bandas de 726 e 936 cm^{-1} poderiam ser correlacionadas com a presença de sistema de anéis aromáticos, semelhantes as encontradas para a caulerpina (AGUILAR-SANTOS, 1970; KAMAL et al., 2012). A presença do grupo éster foi sugerida pelas absorções em 1695 cm^{-1} , a qual corresponde ao estiramento C=O e 1265 cm^{-1} relacionado ao estiramento do grupo C-O, o sinal corresponde ao deslocamento da carbonila para uma menor frequência pode ser devido ao deslocamento dos elétrons π para a ligação C=O aumentando o caráter de ligação simples das ligações C=O no híbrido de ressonância, assim, dessa forma diminui suas constantes de força (KAMAL et al., 2012).

Figura 21. Espectro de infravermelho (IV) e ultravioleta (UV) do etil metil caulerpinato



No espectro de ^1H RMN (Figura 22) foi possível encontrar a presença de 18 prótons. Os valores de desvio químico estão em δ_{H} 3,76 (3H, s, OCH_3), δ_{H} 7,20 e 7,63 (8H, m, Ar-H), 8,15ppm (2H, s, 2 =CH) e δ_{H} 9,1 (2H, s, 2NH). Os valores em δ_{H} 7,20, 7,63 e 8,15 sugerem a presença de dois anéis aromáticos condensados. A Figura 16 mostra a expansão da região referente aos hidrogênios do anel aromático, o qual possui um duplete orto em δ_{H} 8,15 ($J = 3.1$ Hz, H-4/H-4'), dois duplos dupletos em orto δ_{H} 7,43 (H-7/H-7') e δ_{H} 7,33 (H-6/H-6') e um duplo tripleto em orto entre os hidrogênios em δ_{H} 7,15 (H-5/H-5'), esses sinais indicam a presença de anel aromático do tipo indólico com dois substituintes em *orto* (PAVIA et al., 2010). A presença de um simpleto em δ_{H} 11,35 refere-se ao hidrogênio ligado a nitrogênio, característico para alcaloides que possui anel indólico [12]. Além disso, no espectro foi possível identificar um simpleto em δ_{H} 3,76 característico para hidrogênio de metoxila (PAVIA et al., 2010, SILVERSTEIN et al., 2007). Os sinais característicos desta substância que a diferencia da caulerpina são apenas dois, os quais indicam a presença do grupo acetoetila em um dos substituintes do anel ciclooctatetraeno que correspondem ao quarteto em δ_{H} 4,28, sinal para hidrogênio próximo a metóxila ($-\text{OCH}_2$) e ao tripleto em δ_{H} 1,49, característico de hidrogênio metilênico (PAVIA et al., 2010).

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 23) foi possível observar vários sinais que concordam com a estrutura da caulerpina (Tabela 7), mesmo observando a perda da simetria para esta nova molécula foi possível a observação de todos os deslocamentos dos carbonos com sinais semelhantes aos deslocamentos dos carbonos da caulerpina (KAMAL et al., 2012). A presença dos sinais entre δ_{C} 111,6 e 142,9 confirmaram a presença do anel aromático porque são característicos de carbono hibridizado em sp^2 . O sinal em δ_{C} 52,6 sugere a presença de uma metoxila e o sinal em δ_{C} 10/10' 165,13 / 165,70 ppm indica a presença de carbonila de éster. Entretanto, os sinais dos carbonos que diferenciam a estrutura do análogo da caulerpina são apenas dois, os quais indicam a presença do grupo acetoetila em um dos substituintes do anel ciclooctatetraeno, C11 δ 14,09 e C12 δ 60,88 ppm respectivamente (Figura 24).

Além dos sinais nos espectros unidimensionais de ^1H e ^{13}C , as análises dos espectros bidimensionais, HSQC (Figura 25) e HMBC (Figura 26), os quais correlacionam os sinais de hidrogênio e carbono a uma e duas ligações, respectivamente fortaleceram o argumento da presença do grupo acetoetila, grupo

este que torna esta molécula assimétrica e com estrutura molecular distinta da caulerpina. No espectro de HSQC é possível visualizar a correlação a uma ligação do C12 (CH₂) δ 60,88 ppm com o hidrogênio ligado a ele, o qual tem δ_H 4,28 que corresponde exatamente ao quarteto do espectro de ¹H observado na Figura 9. A correlação a duas ligações é mostrada na expansão do espectro de HMBC entre os sinais de C12 δ 60,88 ppm que corresponde ao CH₂ com o tripleto em δ_H 1,49, o qual é proveniente dos hidrogênios do CH₃ mostrando que eles estão ligados, com isso é possível a confirmação de que o grupo de acetoetila está presente na estrutura química dessa substância (Figura 26). Baseado nos resultados espectroscópicos, o composto isolado foi caracterizado e sugerido como etil metil caulerpinato, novo alcaloide indólico análogo a caulerpina (Figura 27). Os dados espectrais estão em concordância com os relatórios anteriores sobre caracterização da caulerpina (AGUILAR-SANTOS, 1970; KAMAL et al., 2012).

Figura 22. Espectro de RMN de ^1H do etil metil caulerpinato com expansões (800MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

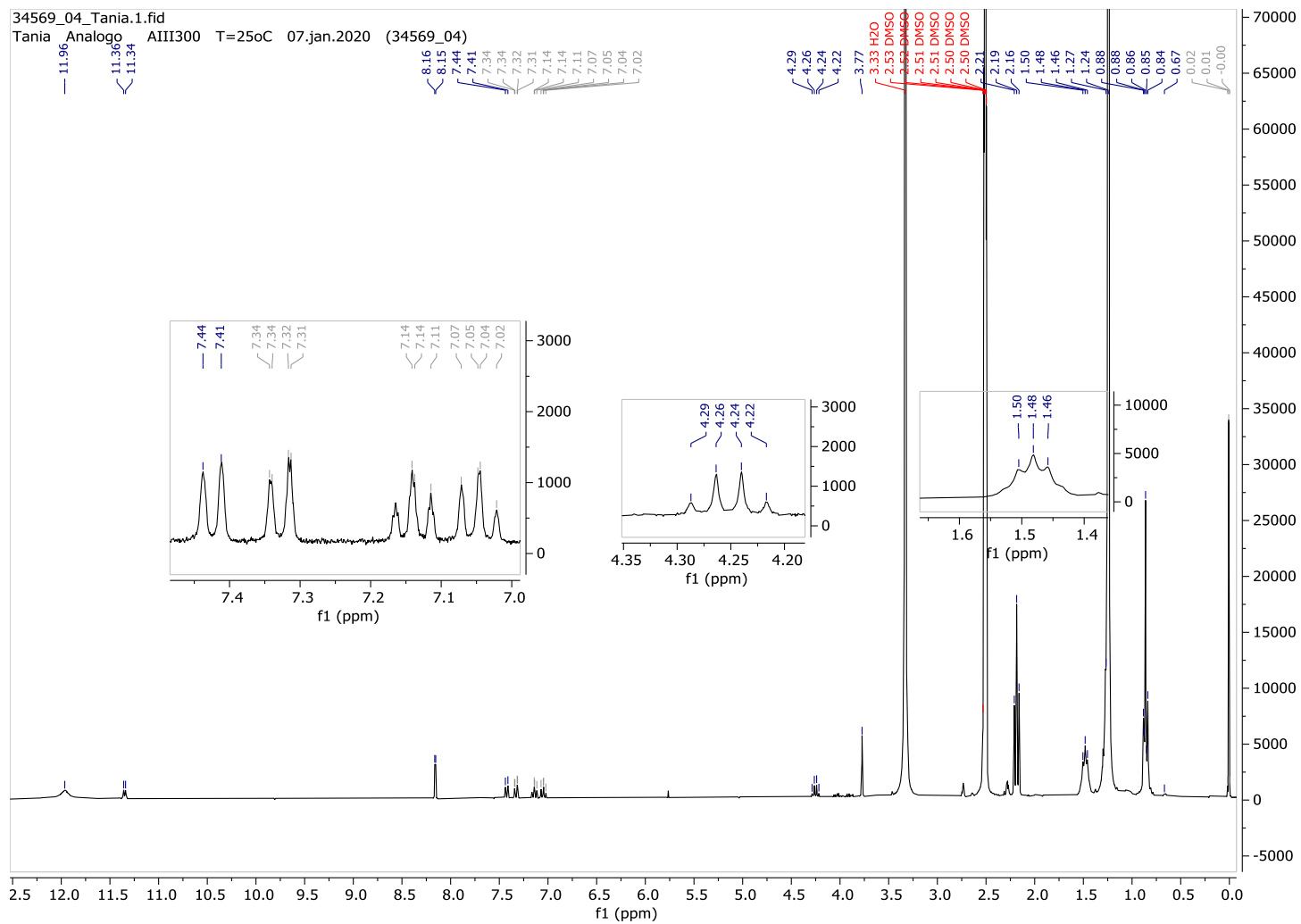


Tabela 7. Dados de RMN de ^1H do etil metil caulerpinato registrados em $\text{DMSO-}d_6$

^1H	δ_{H}	δ_{C}
C		
2/2'	-	132,77/132,87
3/3'	-	111,09 / 111,63
3a/3a'	-	126,84/ 126,84
7a/7a'	-	137,41 / 137,41
8/8'	-	126,06 / 125,78
10/10'	-	165,13 / 165,70
CH		
4/4'	8,19(d, J=3.1 Hz, 2H)	117,70 / 117,70
5/5'	7,20 (dt, 2H)	119,94 / 119,94
6/6'	7,50 (dd, 2H)	122,61/ 122,61
7/7'	7,63 (dd, 2H)	111,10 / 111,63
9/9'	--- (s, 2H)	141,53 / 141,22
CH₃		
11/11'	1,49 (t, J= 7.0 Hz, 3H) / 3,76 (s, 3H)	14,09 / 52,14
CH₂		
12	4,28 (q, J= 7.0 Hz, 2H)	60,88

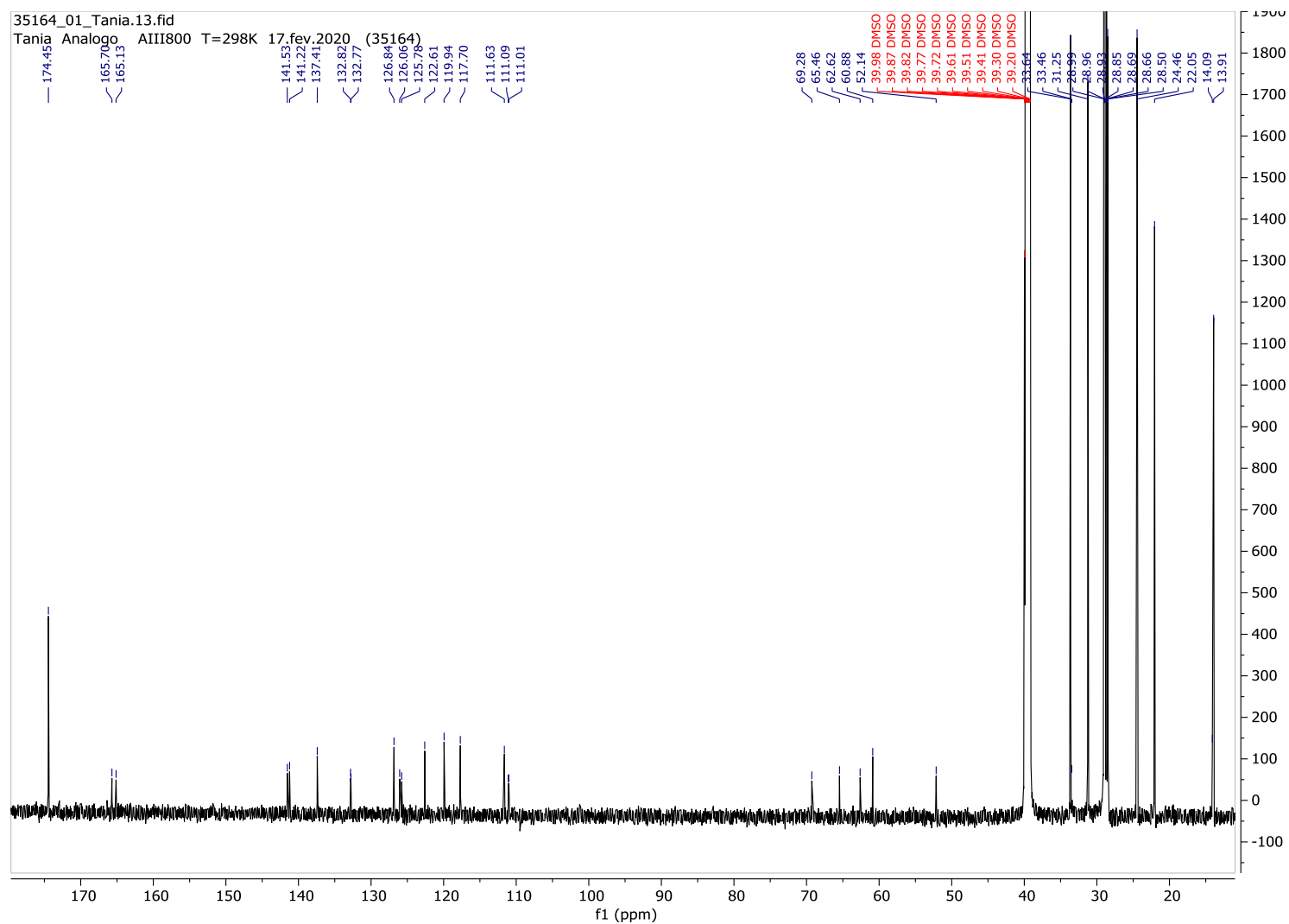
Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C do etil metil caulerpinato (800MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

Figura 24 Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C na região 110-190 ppm do etil metil caulerpinato (800MHz, DMSO- d_6)

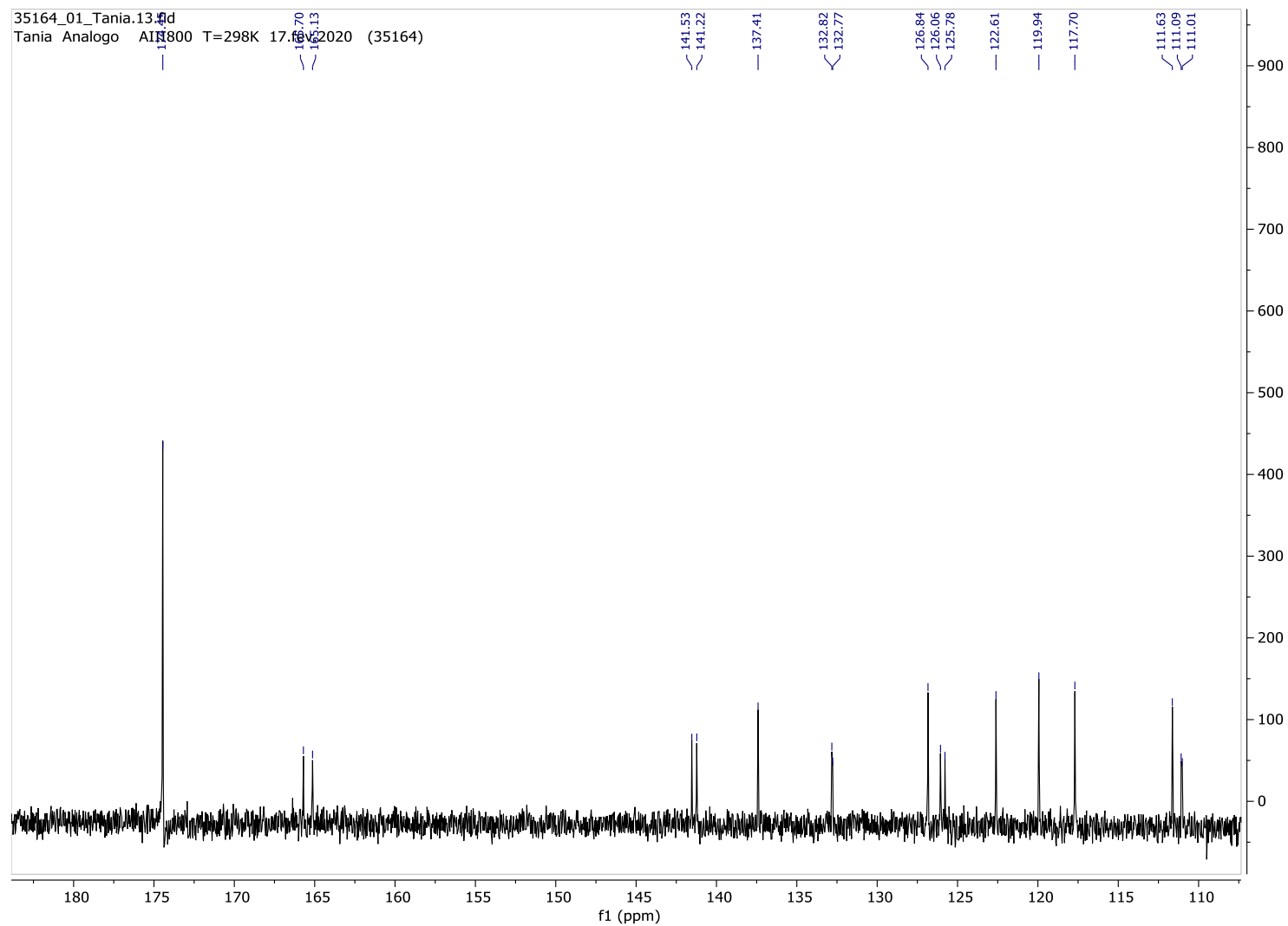


Figura 25. Expansão do espectro de HSQC do etil metil caulerpinato mostrando a correlação de CH₂ ¹³C 60.83 e ¹H δ 4.28 ppm

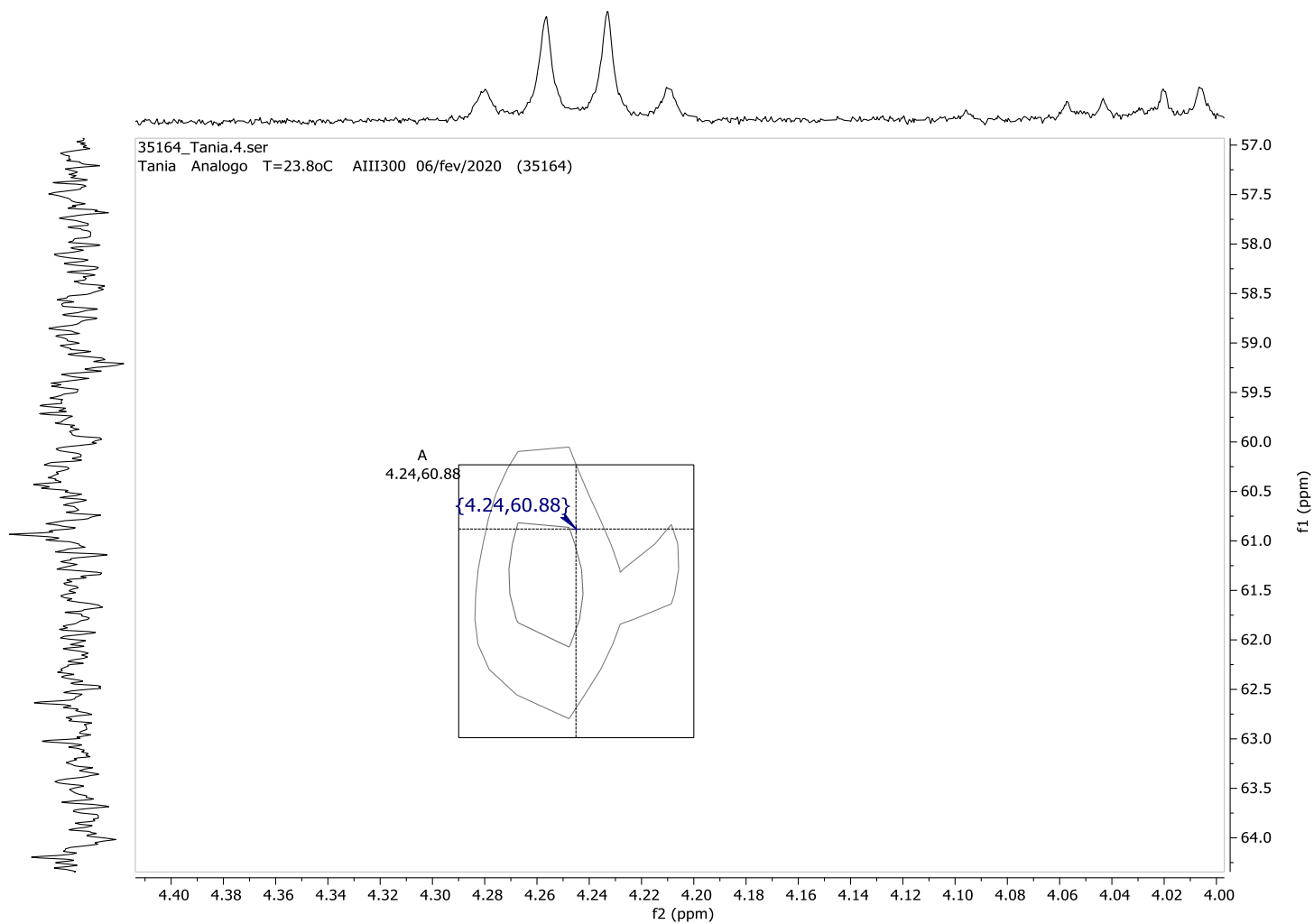


Figura 26. Espectro de HMBC com expansão do etil metil caulerpinato mostrando a correlação entre os sinais de CH₂ 60.83 e CH₃ δ_H1.46

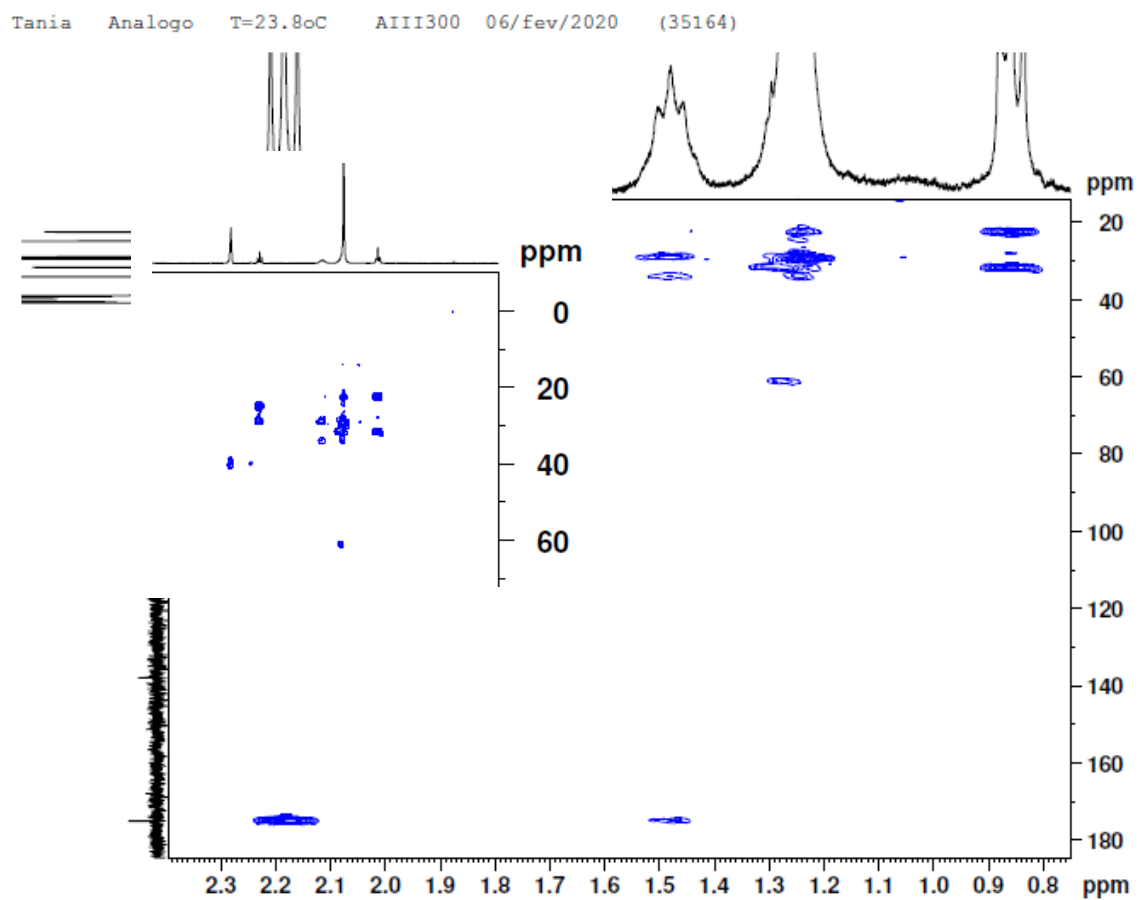
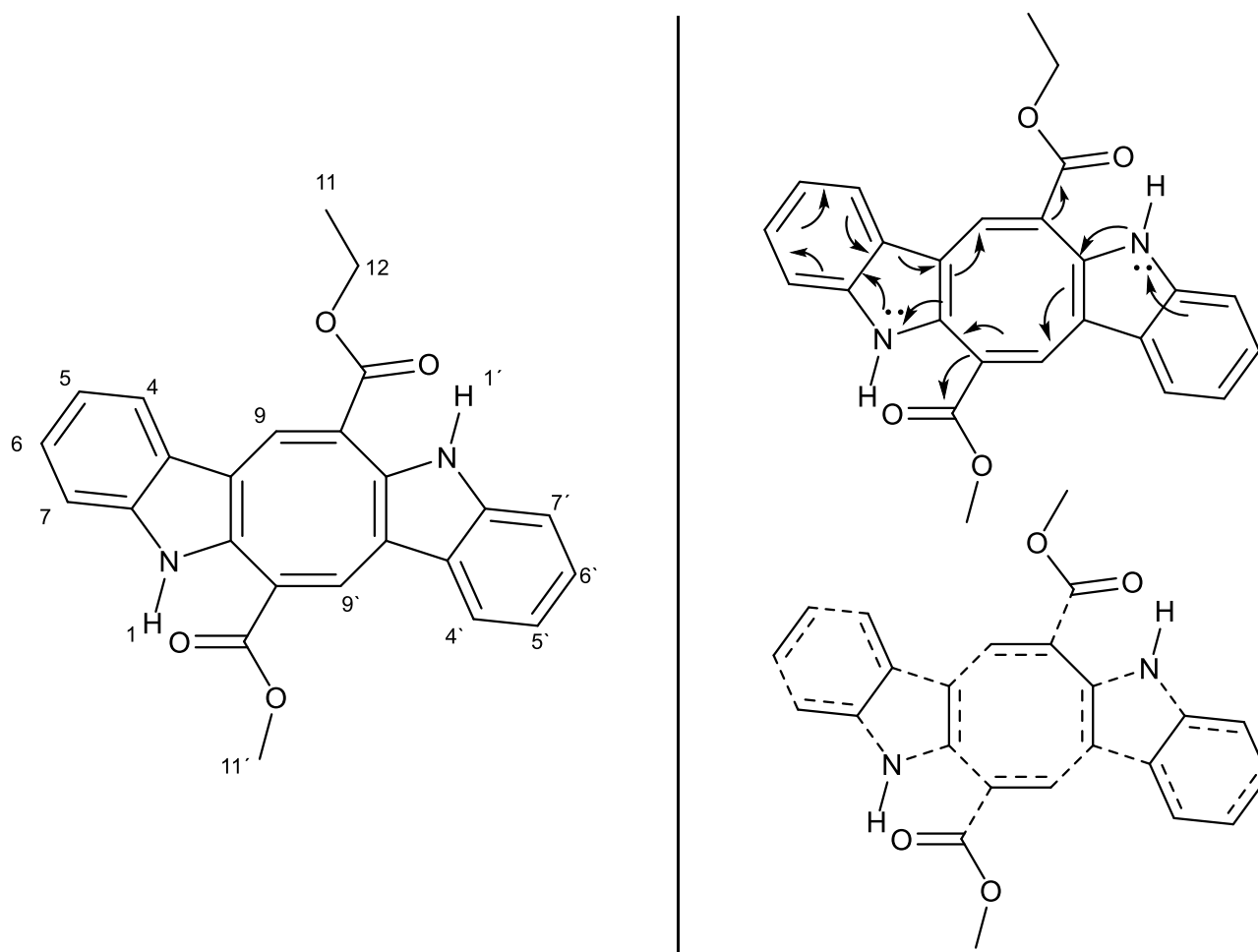


Figura 27. Estrutura química proposta para o etil metil caulerpinato e seu híbrido de ressonância

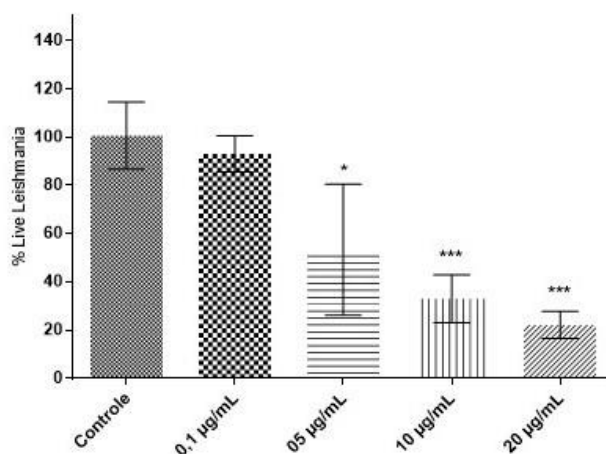


5.3 ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO EXTRATO E DAS FRAÇÕES DE SPE DA CAULERPA RACEMOSA

Neste trabalho, o extrato etanólico e todas as frações (Fr 10 (%) MeOH, Fr 30 (%) MeOH, Fr 50 (%) MeOH, Fr 70 (%) MeOH, Fr 100 (%) MeOH e AcOEt) foram avaliadas para atividade leishmanicida por meio de ensaios de viabilidade celular contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, sendo testados nas concentrações de 0,1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL e 20 µg/mL e com anfotericina B como controle positivo. Todos os ensaios foram testados em triplicata, por essa razão o resultado é uma média aritmética dos três experimentos realizados.

O extrato etanólico e todas as frações apresentaram atividade leishmanicida significativa, porém houve variação no resultado em relação as diferentes concentrações testadas. O extrato etanólico demonstrou atividade leishmanicida significativa somente na concentração de 20 µg/mL e foi negativo para as concentrações de 0,1 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL (Gráfico 1).

Gráfico 1. Viabilidade de *L. amazonensis* verificada por ensaio de MTT do extrato etanólico da *C. racemosa*.

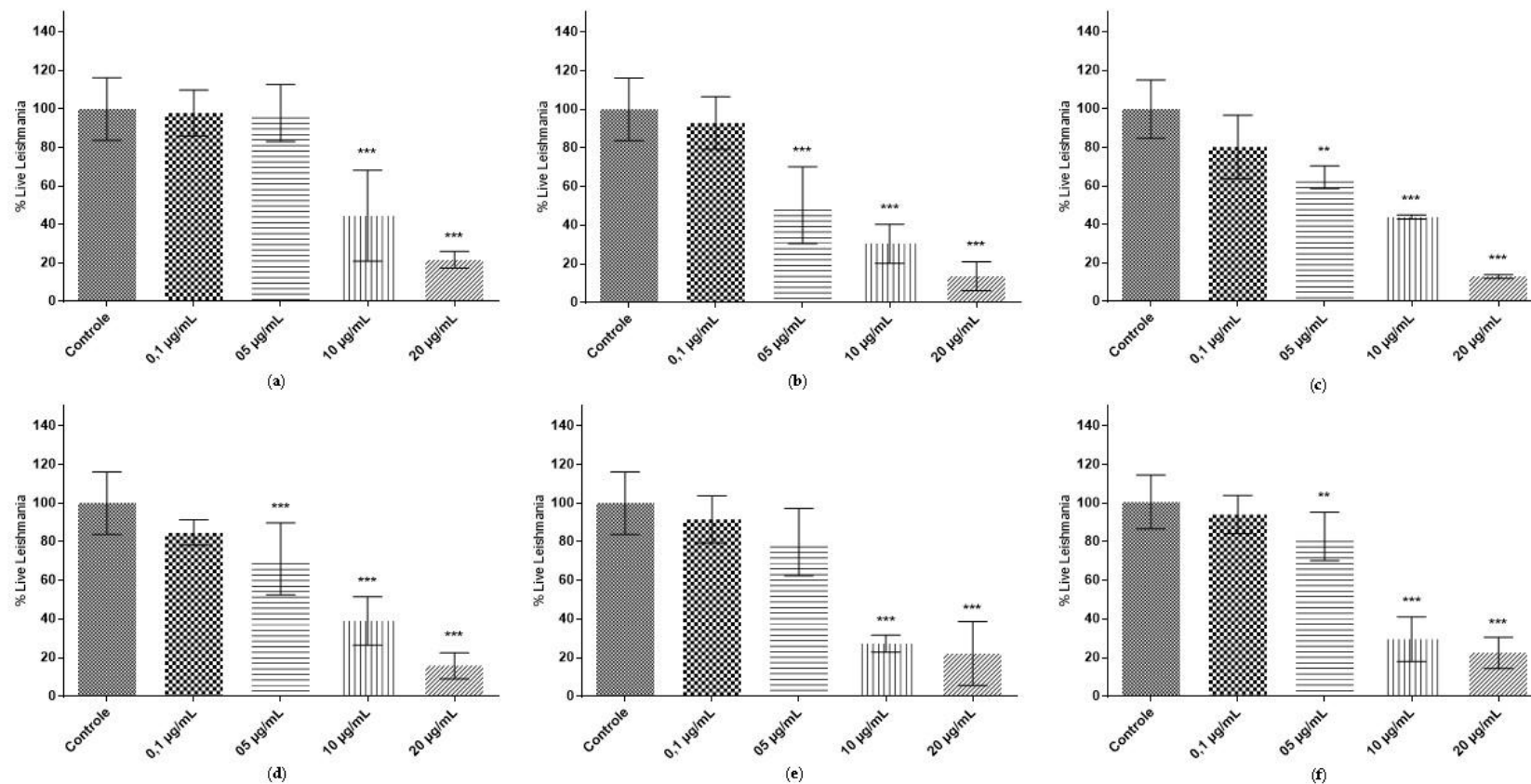


Comportamento diferente foi observado quando comparado com as frações de SPE, visto que a Fr 10 e 100 (%) MeOH mostraram-se efetivas a partir de 10 µg/mL, ao passo que as Fr 30, 50, 70 (%) MeOH e AcOEt expressaram significativa atividade com 5 µg/mL, sendo que para a concentração de 0,1 µg/mL nenhuma delas mostrou ação leishmanicida significativa (Gráfico 2). Estas diferenças podem ser explicadas pela metodologia que foi utilizada, uma

vez que os cromatogramas mostram que a extração em fase sólida serviu tanto para separar substâncias quanto para concentrá-las em determinadas frações, desta maneira em menores valores de microgramas elas conseguem expressar melhor a atividade leishmanicida do que o extrato bruto precursor das mesmas.

Observou-se que as Fr 10 e 30 (%) MeOH tiveram significativa atividade leishmanicida com as concentrações de 10 e 20 µg/mL para a Fr 10% e 5, 10 e 20 µg/mL para Fr 30 (%) MeOH. Este resultado pode ser devido a presença do ácido caulerpínico, identificado nessas frações pelo espectros de massas (UPLC), além dos dados de correlação do UV que mostram que o ácido caulerpínico encontra-se em maior concentração nessas duas frações em relação as outras. Desta forma, o ácido caulerpínico presente nessas frações pode estar atuando em sinergia com outras moléculas, contribuindo para a ação biológica, tendo em vista que em estudos anteriores ácido caulerpínico produzido por semi-síntese tendo como substrato de partida a caulerpina isolada de *C. racemosa* teve atividade leishmanicida comprovada (SOUSA, 2016).

Gráfico 2. Viabilidade de *L. amazonensis* verificada por ensaio de MTT das frações obtidas por SPE da *C. racemosa*: (a) Fr 10 (%) MeOH; (b) Fr 30 (%) MeOH; (c) Fr 50 (%) MeOH; (d) Fr 70 (%) MeOH; (e) Fr 100 (%) MeOH; (f) Fr AcOEt.



O extrato etanólico foi efetivo com IC₅₀ em 9,7 µg/mL (Tabela 8) dado que corrobora com resultados obtidos em outros estudos, os quais a partir de extratos alcoólicos de algas marinhas também foi demonstrada atividade leishmanicida contra espécies de *Leishmania* sp., por exemplo, o trabalho realizado com a alga vermelha *Osmundaria obtusiloba* (C. AGARDH) que verificou moderada atividade in vitro contra formas promastigotas de *L. amazonensis* com concentração inibitória (IC₅₀) em 24,5 µg/mL (LIRA et al., 2015). Ainda, outra espécie do gênero Caulerpa, *C. sertularioides*, coletada da costa do Golfo Persa demonstrou atividade leishmanicida, sendo que através do extrato aquoso, o qual foi testado in vitro contra formas promastigotas da *L. major* com IC₅₀ em 85 µg/mL (FOULADVAND, 2011). Resultados semelhantes foram observados também em estudos utilizando extratos alcoólicos da *C. racemosa*, como por exemplo um trabalho realizado com alga coletada do Mar Mediterrâneo, o qual o extrato metanólico foi testado contra formas amastigotas de *L. donovani* sendo este efetivo com IC₅₀ em 22,6 µg/mL (SÜZGEÇ-SELÇUK et al., 2011). A literatura relata também atividade semelhante para *C. racemosa* coletada da costa do Paquistão, a qual foi testada contra formas promastigotas da *L. major* e confirmou possuir atividade significativa com IC₅₀ em 37,5 µg/mL (SABINA et al., 2005). A diferença nos valores de IC₅₀ encontrados pode estar relacionado com as diferentes regiões geográficas que as algas foram coletadas, uma vez que o ambiente influencia diretamente a produção de diferentes metabolitos secundários (DEWICK et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2013), como também o fato de serem espécies diferentes de *Leishmania* sp. e alguns dos extratos avaliados terem sido preparado com solvente diferente do etanol (YAMTHE et al., 2017).

Porém, além da atividade leishmanicida, a literatura relata outras ações biológicas atribuídas ao extrato etanólico de *C. racemosa*, por exemplo, a atividade antibacteriana do extrato etanólico contra as espécies de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* e atividade antinoceptiva do extrato metanólico, o qual reduziu em 47,39% a nocicepção produzida pelo ensaio de teste de contorção utilizando o ácido acético (SRIVASTAVA et al., 2010; SOUZA et al., 2009).

Tabela 8. Concentração inibitória (IC₅₀) das frações obtidas por SPE e extrato etanólico da *C. racemosa* para a ação leishmanicida com *L. amazonensis*

Fração ou Extrato	IC ₅₀ (CI 95%)
Fr 10 MeOH	11,71 (9,41 a 14,57)
Fr 30 MeOH	2,59 (1,74 a 3,86)
Fr 50 MeOH	9,74 (7,80 a 12,17)
Fr 70 MeOH	11,06 (9,31 a 13,13)
Fr 100 MeOH	11,64 (6,23 a 21,71)
Fr AcOEt	11,29 (9,02 a 14,12)
Extrato EtOH	9,75 (7,42 a 12,82)

A atividade leishmanicida do extrato e das frações observada neste trabalho corrobora também com os resultados de outros estudos realizados com espécies de algas coletadas da costa do Brasil e que obtiveram também atividade leishmanicida contra a *L. amazonensis*. A exemplo, um estudo realizado no Brasil com duas populações de alga vermelha *Laurencia dendroidea*, uma coletada no Rio de Janeiro (população A) e outra no Espírito Santo (população B), as quais tiveram seus extratos lipofílicos testados apresentando IC₅₀ em 17,9 µg/mL para o extrato A e IC₅₀ em 34,2 µg/mL para o extrato B (MACHADO et al., 2011). Outro trabalho com alga vermelha *Bostrychia tenella* (J. AGARDH), coletada da costa de São Paulo, da qual preparou-se extrato diclorometano:metanol na proporção (2:1), em seguida fracionado por partição com solventes orgânicos (hexano e diclorometano) formando as frações n-hexano (BT-H) e diclorometano (BT-D). Elas foram conduzidas a cromatografia em coluna utilizando sílica gel gerando as subfrações H02, H03, D01 e D02, as quais tiveram atividade contra *L. amazonensis* exibindo valores de IC₅₀ em 1,5, 2,7, 4,4 e 4,3 g/mL, respectivamente (FELÍCIO, 2010). De modo semelhante, um estudo *in vitro* avaliou a atividade leishmanicida de uma fração polissacarídica sulfatada, a qual foi extraída da *C. racemosa*, coletada na costa de Fortaleza, e demonstrou que a fração possuiu ação significativa na inibição no crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* com um valor de IC₅₀ em 34,5 µg/mL (PIRES et al., 2013).

CONCLUSÃO

A partir do fracionamento do extrato etanólico da *Caulerpa racemosa*, obteve-se seis frações por extração em fase sólida, das quais foram identificados principalmente alcaloides do tipo indólico, sendo eles: monometil caulerpinato, ácido caulerpínico, caulersina e caulerpina, sendo esta última um metabólito secundário majoritário para as algas do Gênero *Caulerpa* relatado em mais de vinte espécies. Para mais disso, um novo alcaloide bis-indólico derivado da caulerpina foi isolado através da cromatografia em coluna, e sua identificação realizou-se por meio de técnicas espectroscópicas de infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C .

Baseado nas análises das frações por UPLC-ESI- q TOF-MS², constatou-se que os constituintes foram sendo separados conforme sua polaridade, tendo em vista que para a obtenção das frações de SPE seguiu-se um gradiente de concentração dos solventes. Para isso, aumenta-se gradativamente o solvente metanol, 10,30,50,70,100 % respectivamente e por fim a última fração apenas com acetato de etila a 100 %. Na análise do ultravioleta, foi visto que os alcalóides identificados tem maior concentração em diferentes frações.

Em relação a atividade leishmanicida contra as formas promastigostas de *L. Amazonensis* todas as frações de SPE da *C. racemosa* tiveram atividade significativa nas concentrações de 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ e foi comprovada também a atividade para o extrato etanólico. Deste modo, portanto, se faz necessário mais estudos, a fim de averiguar quais seriam os possíveis mecanismos para esta atividade e qual (is) substância (s) presente nessas frações são responsáveis por esta ação.

REFERÊNCIAS

AGUILAR-SANTOS, G. Caulerpin, a New Red Pigment from Green Algae of the Genus *Caulerpa*. **Journal of the Chemical Society**, 1970.

ALARIF, W. M.; ABOU-ELNAGA, Z. S.; AYYAD, S. N. et al. Insecticidal Metabolites from the Green Alga *Caulerpa racemose*. **CLEAN – Soil, Air, Water**, v. 38, n. 5, p. 548–557, 2010.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERNET, C. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of its Incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, 2012.

ANDRADE-NARVÁEZ, F. J.; VARGAS-GONZÁLEZ, A.; CANTO-LARA, S. B. et al. Clinical Picture of Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatan Peninsula, Mexico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n.2, p. 163-167, 2001.

ANJANEYULU, A. S. R.; PRAKASH, C. V. S.; MALLAVADHANI, U. V. Two caulerpin analogues and a sesquiterpene from *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 9, p. 3041-3042, 1991.

BELTON, G. S.; DRAISMA, S. G. A.; PRUD'HOMME VAN REINE, W. F. et al. A taxonomic reassessment of the diversity of *Caulerpa* (Chlorophyta, Caulerpaceae) from southern Australia based on tufA and rbcL sequence data. **Phycologia**, v. 58, n. 3, p. 234–253, 2019.

BENNIS, I.; BROUWERE, V.; BELRHITI, Z. et al. Psychosocial burden of localised cutaneous Leishmaniasis: a scoping review. **BMC Public Health**, v. 18, n. 358, 2018.

BITERCOURT, M. A. O.; DANTAS, G. R.; LIRA, D. P. et al. Aqueous and Methanolic Extracts of *Caulerpa mexicana* Suppress Cell Migration and Ear

Edema Induced by inflammatory Agents. **Marine Drugs**, v.9, n.8, p.1332-1345, 2011.

BRAYNER, S.; PEREIRA, S. M. B.; BANDEIRA-PEDROSA, M. E. Taxonomia e distribuição do gênero *Caulerpa* Lamouroux (Bryopsidales – Chlorophyta) na costa de Pernambuco e Arquipélago de Fernando de Noronha, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 4, p. 914-928, 2008.

CABRITA, M. T.; VALE, C.; RAUTER, A. P. Halogenated Compounds from Marine Algae. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2301-2317, 2010.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; FALCÃO, M. A. P.; VIEIRA, A. C. S. 1 et al. Assessment of Mechanisms Involved in Antinociception Produced by the Alkaloid Caulerpine. **Molecules**, v. 19, p. 14699-14709, 2014.

CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V.; RAJ, G. A. Antibacterial activity of selected marine macro algae against vancomycin resistant *Enterococcus faecalis*. **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 2, n. 12, p. 940-946, 2014.

CHEN, X.; SUN, Y.; LIU, H. et al. Advances in cultivation, wastewater treatment application, bioactive components of *Caulerpa lentillifera* and their biotechnological applications. **Peer Journal**, 2019.

CHENG, F.; ZHOU, Y. WU, J. et al. Constituintes químicos de *Caulerpa peltata*. **Shizhen Guoyi guoyao**, v. 9, p. 856-857, 2008.

CLIFTON, K. E.; CLIFTON, L. M. The phenology of sexual reproduction by green algae (Bryopsidales) on Caribbean coral reefs. **Journal of Phycology**, v. 35, p. 24–34, 1999.

COLLADO-VIDES, L.; RUESINK, J. Morphological plasticity and invasive potential. In: Williams E, Grosholz E (eds) International *Caulerpa taxifolia* Conference Proceedings. San Diego, California, p. 88–118, 2002.

CREMEN, M. C. M.; LELIAERT, F.; MARCELINO, V. R. et al. Large diversity of nonstandard genes and dynamic evolution of chloroplast genomes in siphonous green algae (Bryopsidales, Chlorophyta). **Genome Biology and Evolution**, v. 10, p. 1048–1061, 2018.

DAGNINO, A. P.; BARROS, F. M.; CCANA-CCAPATINTA, G. V. et al. Leishmanicidal activity of lipophilic extracts of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 22, n. 1, p. 71-76, 2015.

DA MATTA, C. B.; SOUZA, É. T.; QUEIROZ, A. C et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activity from algae of the genus *Caulerpa*. **Marine Drugs**, v.9, n. 3, p. 307-318, 2011.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products. 3^a Edition. West Sussex: John Wiley & Sons, 2009.

FARAG, M. A.; WESSJOHANN, L. A. Metabolome Classification of Commercial *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) Preparations via UPLC-q-TOF-MS and Chemometrics. **Planta Medica**, v.78, n.5, p.488-496, 2012.

FELÍCIO, R.; ALBUQUERQUE, S.; YOUNG, M. C. M. et al. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 763–769, 2010.

FOULADVAND, M., BARAZESH, A.; FAROKHZAD, F. et al. Evaluation of in vitro anti-Leishmanial activity of some brown, green and red algae from the Persian Gulf. European. **Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 15, p. 597-600, 2011.

GALGANI, I.; PESANDO, D.; PORTHE-NIBELLE, J. et al. **Biochemical Toxicology**, v. 11, p. 243, 1996.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, n. 30, v.2, p. 374-386, 2007.

GUERRIERO, A.; MEINESZ, A.; D'AMBROSIO, M. et al. Isolation of toxic and potentially toxic sesqui- and Monoterpenes from the tropical green seaweed *Caulerpa taxifolia* which has invaded the region of cap Martin and Monaco. **Helvetica Chimica Acta**, v. 75, p. 689-695, 1992.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 01 February, 2020.

KAMAL, C.; GOPALAKRISHNAN SETHURAMAN, M. Caulerpin - A bis-Indole Alkaloid as a Green Inhibitor for the Corrosion of Mild Steel in 1 M HCl Solution from the Marine Alga *Caulerpa racemose*. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 2012.

KERBAUY, G. B. Fisiologia Vegetal. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 470p, 2004.

KUMAR, J. G. S.; UMAMAHESWARI, S.; KAVIMANI, S. Pharmacological Potential of Green Algae *Caulerpa*: A Review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10, n 3, p. 1014-1024, 2019.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v. 273, p. 595-600, 1987.

LIRA, D. P. Constituintes químicos e atividade biológica dos organismos marinhos: *Caulerpa mexicana*, *Bryothamnion triquetrum*, *Hypnea musciformis* e *Ircinia felix*. 2016. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2013.

LIRA, M. F.; LOPES, R.; gomes, a. p. et al. Anti-leishmanial activity of Brazilian green, brown, and red algae. **Journal of Applied Phycology**, 2015.

LIU, A.; LIU, D.; LIANG, T. et al. Cauleprenylols A and B, two rare antifungal prenylated para-xylenes from the green alga *Caulerpa racemosa*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.23, p.2491–2494, 2013.

LIU, D., MAO, S. C.; YU, Q. X. et al. Caulerchlorin, a novel chlorinated bisindole alkaloid with antifungal activity from Chinese green alga *Caulerpa racemosa*. **Heterocycles**, v. 85, p. 661–664, 2012.

LUCENA, L. A. F.; KANAGAWA, A. I.; MARTINS, G. J. M. Levantamento da Flora do Infralitoral do Município de Pitimbu, Litoral Sul do Estado da Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 585-587, 2007.

MACHADO, F. L. S.; PACIENZA-LIMA, W.; ROSSI-BERGMANN, B. et al. Antileishmanial Sesquiterpenes from the Brazilian Red Alga *Laurencia dendroidea*. **Planta Medica**; v. 77, p. 733-735, 2011.

MAO, S. C.; GUO, Y. W.; SHEN, X. Two novel aromatic valerenane-type sesquiterpenes from the Chinese green alga *Caulerpa taxifolia*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.16, p. 2947-2950, 2006.

MARINLIT, A marine literature database produced and maintained by the Department of Chemistry. University of Canterbury, New Zealand, 2020. Disponível em: <http://pubs.rsc.org/marinlit/>.

MARTINS, R. C.; DORNELES, G. P.; TEIXEIRA, V. O. N. et al. Imidazolium salts as innovative agents against *Leishmania amazonensis*. **International Immunopharmacology**, v. 63, p. 101-109, 2018.

NIELSEN, P. G.; CARLÉ, J. S.; CHRISTOPHERSEN, C. Final structure of caulerpicin, a toxin mixture from the green alga *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 7, p. 1643-1645, 1982.

OLIVEIRA, E. C. et al. Algas Marinhas: das origens ao futuro. **Scientific American Séries Oceanos**, v.2. p.70, 2009.

OLIVEIRA-CARVALHO, M. F.; PERREIRA, S. M. B.; ZICKEL, C. S. Florística e distribuição espaço-temporal clorofíceas bentônicas em trechos recifais do litoral norte do estado de Pernambuco – Brasil. **Hoehnea**, v. 30, p. 201-212, 2003.

ORNANO, L.; DONNO, Y.; SANNA, C. et al. Phytochemical study of *Caulerpa racemosa* (Forks.) J. Agarth, an invading alga in the habitat of La Maddalena Archipelago. **Natural Product Research**, p. 1-5, 2014.

PALIĆ, S.; BHAIROSING, P.; BEIJNEN, J. H. et al. Systematic Review of Host-Mediated Activity of Miltefosine in Leishmaniasis through Immunomodulation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 7, 2019.

PAUL, V. J.; LITTLER, M. M.; LITTLER, D. S. et al. Evidence for chemical defense in tropical green alga *Caulerpa ashmeadii* (Caulerpaceae: Chlorophyta). **Journal of Chemical Ecology**, v. 13, p. 1171–1185, 1987.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. et al. Introdução à Espectroscopia. 4 ed. Cengage Learning; São Paulo, 2010.

PERREIRA, S. M. B. et al. Algas bentônicas do estado de Pernambuco. Diagnóstico da diversidade de Pernambuco, **Editora Massangana**: Recife, 2002.

PIRES, C. L.; RODRIGUES, S. D.; BRISTOT, D. et al. Evaluation of Macroalgae Sulfated Polysaccharides on the Leishmania (*L.*) *amazonensis* Promastigote. **Marine Drugs**, v. 11, p. 934-943, 2013.

SABINA, H.; TASNEEM, S.; SAMREEN et al. Antileishmanial activity in the crude extract of various seaweed from the coast of Karachi, Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, v. 37, n. 1, p 163-168, 2005.

SANTOS, A. O.; BRITTA, E. A.; BIANCO, E. M. et al. 4-Acetoxydolastane Diterpene from the Brazilian Brown Alga *Canistrocarpus cervicornis* as Antileishmanial Agent. **Marine Drugs**, v. 9, p. 2369-2383, 2011.

SCHWEDE, J. G., CARDELLINA, I. I., GRODI, S. H. et al. Distribution of the caulerpin in species of the green alga *Caulerpa*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 155–158, 1987.

SHALABY, E. A. Algae as promising organisms for environment and health. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, p. 1338-1350; 2011.

SHARMA, B. R.; RHYU, D. Y. Anti-diabetic effects of *Caulerpa lentillifera*: stimulation of insulin secretion in pancreatic β -cells and enhancement of glucose uptake in adipocytes. **Asian Pacific Journal of tropical Biomedicine**, v. 4, n. 7, p. 575-580, 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SMYRNIOTOPOULOS, V.; ABATIS, D.; TZIVELEKA, L. et al. Acetylene Sesquiterpenoid Esters from the Green Alga *Caulerpa prolifera*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 21-24, 2003.

SOARES, D. C.; CALEGARI-SILVA, T. C., LOPES, U. G. et al. Dolabelladientriol, a Compound from *Dictyota pfaffii* Algae, Inhibits the Infection by *Leishmania amazonensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, 2012.

SOUSA, J. C. F. Semi-síntese de novos derivados da *Caulerpina* e avaliação da atividade leishmanicida do ácido caulerpínico. 2016. Tese (Doutorado em Farmacoquímica) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2016.

SOUZA, E. T. et al. The antinociceptive and anti-inflammatory actives of Caulerpin, a bisindole alkaloid, isolated from seaweeds of the genus *Caulerpa*. **Marine Drugs**, v. 7. n. 4, p. 689-704, 2009.

SRIVASTAVA, N.; SAURAV, K.; MOHANASRINIVASAN, V. et al. Antibacterial Potential of Macroalgae Collected from the Madappam Coast, Índia. **British Journal of Pharmacology and Toxicology**, v.1, n.2, p. 72-76, 2010.

SU, J-Y.; ZHU, Y.; ZENG, L-M. et al. A new bisindole from alga *Caulerpa serrulate*. **Natural Products Reports**, v. 60, n. 10, p. 1043-1044, 1997.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXONA, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, p. 817-836, 2003.

SUN, Y.; GONG, G.; GUO, Y. et al. Purification, structural features and immunostimulatory activity of novel polysaccharides from *Caulerpa lentillifera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 314-323, 2018.

SUNYOTO, T.; BOELAERT, M.; MEHEUS, F. Understanding the economic impact of leishmaniasis on households in endemic countries: a systematic review. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, 2018.

SÜZGEÇ-SELÇUK, S.; MERİÇLİ, A. H.; GÜVEN, K. C. et al. Evaluation of Turkish Seaweeds for Antiprotozoal, Antimycobacterial and Cytotoxic Activities. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 778–783, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 848p, 2009.

TEIXEIRA, V. L. Produtos Naturais de Algas Marinhas Bentônicas. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 43-362, 2013.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, 2017.

VEST, S. E.; DAWES, C. J.; ROMEO, J. T. Distribution of Caulerpin and Caulerpigin in eight species of the green alga *Caulerpa* (Caulerpales), **Botanica Marina**, v. 26, p. 313-316, 1983.

VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C.; KAISER, M.; DEVAMBEZ, I. et al. Antiprotozoal Activities of Organic Extracts from French Marine Seaweeds. **Marine Drugs**, v. 9, p. 922-933, 2011.

WHO, World Health Organization. **Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas**. WHO, Geneva, Switzerland, 2020.

WYNNE, M. J. A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical Western Atlantic: second revision. Beih. **Nova Hedw**, 2005.

YAMTHE, L. R. T.; APPIAH-OPON, R.; FOKOU, P. V. T. et al. Marine Algae as Source of Novel Antileishmanial Drugs: A Review. **Marine Drugs**, v. 15, n. 323, 2017.

YANG, H.; LIUA, D.; LIANG, T. et al. Racemosin C, a novel minor bisindole alkaloid with proteintyrosine phosphatase-1B inhibitory activity from the green alga *Caulerpa racemose*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 16, n. 12, p. 1158-1165, 2014.

ZUBIA, M.; DRAISMA, S. G. A.; MORRISSEY, K. L. et al. Concise review of the genus *Caulerpa* J.V. Lamouroux. **Journal of Applied Phycology**, 2019.

ANEXO 1 – ARTIGO DE REVISÃO

Artigo de revisão

PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ALGAS VERDES DO GÊNERO CAULERPA

Laisla C. A. Ferreira^a; Ayala N. P. Gomes^a, Celso A. Camara^a, Tania M. S. da Silva^{a,*}

^aDepartamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica, Campus Dois Irmãos, Dois irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brasil.

[\(X\) Manuscrito sem material suplementar](#)

*e-mail: sarmentosilva@gmail.com

*Review***CHEMICAL PROFILE AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF GREEN ALGAE FROM GENUS *CAULERPA*****ABSTRACT**

Algae of the genus *Caulerpa* has been increasingly studied in recent years. The interest in carrying out new studies with this genus is mainly due to the countless morphological variations that these algae present, comprising more than 100 species recognized worldwide, a characteristic that helps them to survive different environmental conditions. In addition, in some eastern countries the seaweed has great economic importance, since several specimens are used on a large scale in the culinary, even being cultivated in large aquariums. In addition, they have a widely varied chemical composition, from alkaloids, terpenes and steroids to aromatic derivatives. Many of these substances exhibit biological properties of interest, such as: antibacterial, anti-inflammatory, antifungal, antidiabetic, antioxidant, among others, which will be described in more detail during the review. All the studies mentioned here served to prove that the *Caulerpa* genus represents a rich source of bioactive compounds, which can be implemented in various food, cosmetic and pharmaceutical products. Unlike existing reviews, this review provides in a condensed form the main chemical and pharmacological studies reported on the *Caulerpa* genus in Brazil and other countries in recent years.

Keywords: Caulerpas; chemical profile; biological properties; algae.

INTRODUÇÃO

O gênero *Caulerpa* é único na Família *Caulerpaceae* da Ordem das *Bryopsidales* (ULVOPHYCEAE, CHLOROPHYTA), com mais de 160 espécies.¹ A distribuição geográfica destas algas é variada, podendo ser encontradas em abundância em águas marinhas rasas, como também em regiões tropicais e subtropicais do mundo, com algumas espécies estendendo-se para o Mar Mediterrâneo, regiões temperadas da Austrália e outras com ocorrência no Brasil, mais precisamente nos estados de Pernambuco e da Paraíba.^{2,3,4}

Nos últimos anos, as caulerpas têm sido alvo de muitos estudos, devido às variações morfológicas encontradas em suas espécies bem como ao seu conteúdo metabólico, tanto o de origem primária (produzidos em maiores proporções), quanto secundária (produzidos em ocasiões especiais e em concentrações menores).⁵ A associação dessas características auxilia à sobrevivência dessas espécies em diferentes habitats. Por terem uma distribuição diversificada e crescimento favorecido pelas toxinas que produzem, algumas delas são cultivadas em grandes aquários nos países da Ásia para servirem de incremento ou na produção de alimentos funcionais, novos fármacos e produtos que promovem o bem-estar humano e animal.^{6,7}

Em relação ao conteúdo majoritário das *Caulerpas sp.*, os carboidratos são as macromoléculas predominantes, cuja proporção oscila entre 3,6 a 83,2% da matéria seca em espécies usadas para fins alimentícios.^{5,8} Nas espécies usadas para o consumo humano, os polissacarídeos são considerados fonte de fibra alternativa, pois favorecem a saciedade rapidamente, bem como auxiliam no fluxo digestivo, ao mesmo tempo que exibem composição diversificada de açúcares (galactose, glicose, arabinose, xilose, manose, ramnose e fucose).^{9,10,11} O conteúdo proteico sofre interferência sazonal (0,6 a 20,8% da matéria seca) e sua qualidade depende da disponibilidade de aminoácidos essenciais do meio. Dentre as substâncias primárias, os lipídios aparecem com as concentrações mais baixas (0,1 a 7,2%).^{5,11}

A presente revisão tem como objetivo evidenciar com mais detalhes apenas os produtos advindos do metabolismo secundário das algas do gênero *Caulerpa* e as atividades biológicas que foram atribuídas aos seus extratos, frações e componentes isolados.

PERFIL QUÍMICO DAS ALGAS DO GÊNERO *CAULERPA*

Entre os produtos naturais isolados no gênero *Caulerpa* é possível verificar uma diversidade na constituição química, sendo relatados mais de 100 compostos isolados¹² entre compostos nitrogenados, terpenoides e esteroides.¹³⁻¹⁷

Alcaloides

Em relação ao gênero *Caulerpa*, constatou-se o alcaloide bis-indólico, caulerpina (**1**), extraída primeiramente de *C. racemosa* e *C. serrulata*,¹⁸ com elucidação da estrutura dada por análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹H) e análises de ultravioleta (UV), posteriormente sucedeu a identificação nas espécies de *C. racemosa* var. *laetevirens*, *C. racemosa* var. *macrophysa*, *C. ashmeadii*,¹⁸ *C. cupressoides*, *C. paspaloides*, *C. prolifera*, *C. sertularioides*,¹⁹ *C. peltata*,^{19,20} *C. racemosa* var. *clavifera*,²¹ *C. taxofolia* e *C. racemosa*.²²⁻²⁶ A partir de dados de RMN, os quais incluem dados de espectrometria uni e bidimensional, obteve-se a confirmação de um novo arranjo estrutural para a caulerpina.^{27,28} Esse arranjo difere principalmente pelos sinais de convergência nos espectros de correlações heteronuclear direta (¹H x ¹³C-HMQC). Com base nesses espectros elucidaram a estrutura da caulerpina como um anel octaédrico insaturado, ligados a estes dois anéis indólicos e como substituinte do anel de oito membros dois grupos de éster metílico, o que causa a diferença da estrutura anterior.²⁹ A caulerpina é o metabólito secundário mais abundante para as caulerpas, com ocorrência em vinte espécies diferentes do Gênero, além disso foi também relatada em espécie de alga vermelha *Chondria lugariya*. Graças a sua maior predominância em relação a outros metabólitos, isolados nas caulerpas, ela é bem estudada, a literatura menciona vários trabalhos descrevendo não apenas sua síntese, mais também a dos seus derivados e suas ações biológicas.^{19,30}

Em menores concentrações encontram-se outros alcaloides, a caulerpicina (**2**), um pseudoalcaloide derivado da esfingosina, o qual na verdade, após várias análises foi identificado como uma mistura de ceramidas que

consiste de três componentes principais e dois de menores proporções, a estrutura **(2)** é representativa desta mistura.³¹ Esse alcaloide é encontrado nas espécies de *C. ashmeadii*, *C. paspaloides*, *C. racemosa* var. *Uvifera*, *C. sertularioides*.^{19,21,31} O ácido caulerpínico **(3)** encontrado na *C. racemosa*²⁹ e *C. mexicana*³² também foi reportado na *C. racemosa* junto com o monometil caulerpinato **(4)**, ambos são caracterizados como pigmentos vermelhos, semelhantes a **(1)** em relação ao arranjo de cinco anéis conjugados, porém se diferenciam da **(1)** pelos substituintes no anel principal, os quais variam entre os grupos de ácido carboxílico e éster metílico.²² A caulersina **(5)** retirada de *C. serrulata* e *C. racemosa* tem sua estrutura também semelhante com a **(1)**, o diferencial entre elas é porque o anel central da **(5)** constitui-se por sete membros e contém uma carbonila em um de seus carbonos.^{16,33} Esse composto possui três isômeros sintéticos³⁴ e sua síntese encontra-se descrita na literatura.^{35,36}

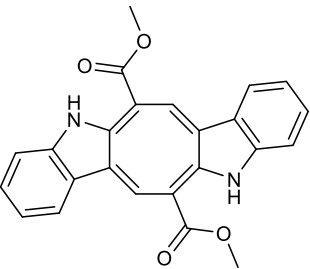
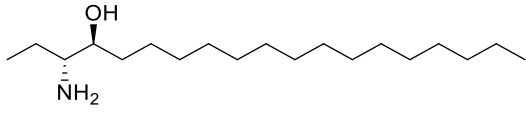
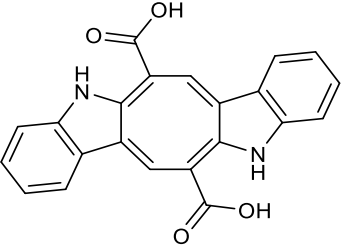
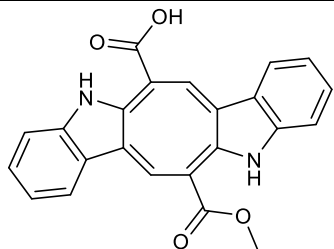
Estudos reportam outros alcaloides naturais, os quais são produtos de reações que têm a caulerpina como substrato de partida, por exemplo, a racemosina-A **(6)** que é produzida através da clivagem oxidativa do anel de oito membros da **(1)**, sendo isolada como um pó amorfo rosa, estruturalmente única tem o seco-indol [3,2-a] ,esqueleto de carbazol com duas unidades de anel do tipo indolenona, ligados entre si por um metil propenoato. Reporta-se ainda seu derivado, racemosina-B **(7)**, a qual foi obtida pelo fechamento do anel central dos carbonos C-2' e C-3, caracterizada como um pó amorfo laranja-amarelado, os dois foram obtidos de *C. racemosa* e identificados primariamente em espécies do Mar da China Oriental.¹³ Há, ainda, um alcaloide classificado como um derivado indol com estrutura análoga a **(7)**, contudo demonstra ausência de quaisquer substituinte em qualquer dos anéis, sendo denominado de 5,11-dihidroindol [3,2-b]-carbazol **(8)** foi elucidado na *C. racemosa*¹⁵ e outro também com esqueleto estrutural semelhante a **(7)**, sendo que com dois substituintes (R= OH e SO₃Na) em um dos anéis indólicos e com um substituinte (R= SO₃Na) também no nitrogênio desse mesmo anel indólico, este composto foi denominado de ancorinazol **(9)** e também foi reportado em espécie de esponja *Ancorina* sp. da Nova Zelândia.³⁷

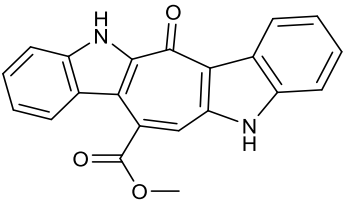
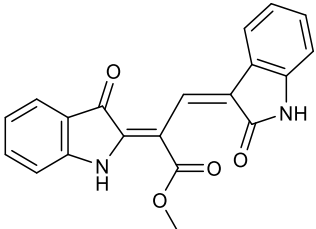
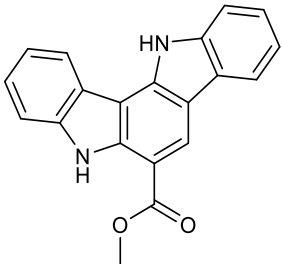
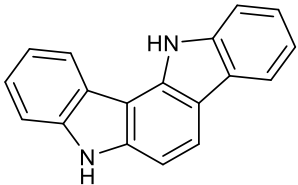
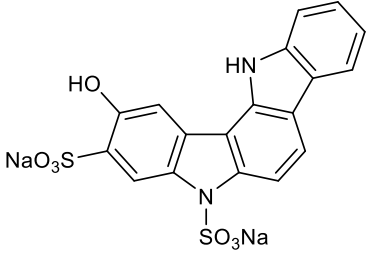
Além dessas, identificaram racemosina-C **(10)** igualmente procedente da **(1)** ou **(4)** por meio de reação de epoxidação, seguida de hidrólise ácida, descarboxilação do grupo ácido ou éster metílico (depende do substrato de

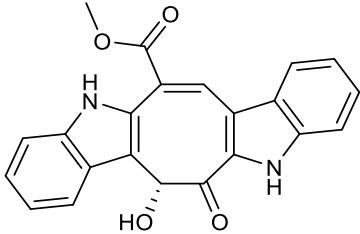
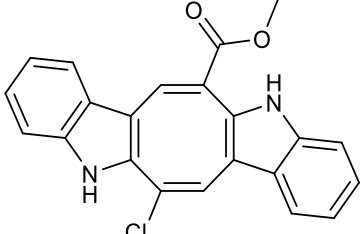
partida) e por fim uma reação de oxidação que introduz uma carbonila no anel central de oito membros, a substância foi caracterizada como um pó de cor amarelo amorfo, opticamente ativa devido a presença de um carbono quiral em sua estrutura.¹⁶ Para mais um novo composto clorado denominado caulerchlorin (**11**) reportou-se na espécie de *C. racemosa*, com estrutura muito semelhante a (**1**), com o diferencial de ter incorporado ao anel central um átomo de cloro e um grupo de éster.³⁸

Todos esses compostos descritos acima foram confirmados estruturalmente por dados de espectrometria.^{13,15,16,38} As estruturas químicas desses alcaloides naturais estão listadas no Quadro 1:

Quadro 1. Estruturas químicas dos alcaloides isolados no gênero *Caulerpa*

Estrutura (s) química (s)	Espécie (s) de <i>Caulerpa</i>
 (1) Caulerpina	<i>C. racemosa</i> , <i>C. racemosa</i> var. <i>laetevirens</i> , <i>C. serrulata</i> , <i>C. lamourouxii</i> , <i>C. racemosa</i> var. <i>macrophysa</i> , <i>C. ashmeadii</i> , <i>C. sertularioides</i> , <i>C. paspaloids</i> , <i>C. cupressoides</i> , <i>C. prolifera</i> , <i>C. peltata</i> , <i>C. racemosa</i> var. <i>clavifera</i> , <i>C. taxofolia</i> , <i>C. lamourouxii</i> , <i>C. lentillífera</i> , <i>C. mexicana</i> , <i>C. peltata</i> , <i>C. trifaria</i> ^{13,15,18-25, 27,28,29, 38}
 (2) L-(-)-erythroesfinganina	<i>C. ashmeadii</i> , <i>C.paspaloids</i> , <i>C. racemosa</i> var. <i>uvifera</i> , <i>C. sertularioides</i> , <i>C. lentillífera</i> ^{19,29,31,38}
 (3) Ácido caulerpínico	<i>C. sertularioides</i> , <i>C. mexicana</i> <i>C. racemosa</i> ^{15,22,29,31,32,38}
 (4) Monometil caulerpinato	<i>C. racemosa</i> ^{19,22,23,31,38}

 (5) Caulersina	<i>C. racemosa</i>, <i>C. serrulata</i>^{16,33,38}
 (6) Racemosina-A	<i>C. racemosa</i>^{14,15,16}
 (7) Racemosina-B	<i>C. racemosa</i>¹⁴
 (8) 5-11-dihidroindol-[3,2-<i>b</i>]-carbazol	<i>C. racemosa</i>¹⁵
 (9) Ancorinazol	<i>C. racemosa</i>¹³

 (10) Racemosina-C	<i>C. racemosa</i>¹⁶
 (11) Caulerchlorin	<i>C. racemosa</i>³⁸

Terpenos e esteróides

As algas do Gênero *Caulerpa* igualmente apresentam substâncias da classe dos terpenos ou derivados de isoprenos, eles são bastante distribuídos no reino vegetal e mostram uma ampla diversidade estrutural, geralmente insolúveis em água, constituídos pela fusão de unidades isoprênicas de 5 carbonos (C5), sendo subdividido e classificado de acordo com a quantidade de unidades C5, monoterpenos (2 unidades), sesquiterpenos (3 unidades), diterpenos (4 unidades), triterpenos (6 unidades), tetraterpenos (8 unidades) e politerpenoides (mais de 8 unidades).³⁹

Na espécie *C. prolifera*, relatou-se primariamente a caulerpenina (**12**), uma toxina presente em algumas espécies desse gênero, a qual também já foi isolada em estudos posteriores na *C. racemosa*. Ela possui em sua composição um isômero, a oxitoxina (**13**), cuja forma é dita como mais desprotegida molecularmente, foi encontrada na espécie *C. taxifolia* e isolada do molusco *Opoglossan sacoglossan Oxynoe olivácea*.^{25,40,41}

Outrossim, dois derivados sesquiterpenoides acetilênicos análogos da caulerpenina, (**14** e **15**) conseguidos a partir do extrato de diclorometano.⁴² Ainda nessa espécie, um total de dezesseis (**16** ao **31**) sesquiterpenoides acetilênicos foram encontrados, e suas estruturas elucidadas pelas análises dos dados de espectrometria. Eles reúnem-se em dois grupos: o primeiro de derivado da caulerpenina 1,2-di-hidro- (2a-2i) e o segundo derivado da caulerpenina 1,2,3,3 ϕ -tetra-hidro-2,3-didesidro (3a-3f), nomenclatura esta que faz referência a cadeia carbônica principal, o que causa a diferença principalmente pela substituição que ocorre no grupo acetóxi terminal de vinil-caulerpenina, o qual apresentou distintos resíduos de cadeias de ácidos graxos.⁴⁰ Outros dois sesquiterpenos acetilênicos foram reportados em *C. flelixis*, a flexilina (**32**) e *C. mexicana*, a trifarina (**33**).^{43,44}

Identificou-se, também, na *C. racemosa* um novo sesquiterpenoide, o ácido 10-ceto-3,7,11-trimetildodecanoico (**34**)²² e em estudo continuado partindo do extrato clorofórmico, novos cinco subsequentes aromáticos foram reportados pela primeira vez nessa espécie, sendo eles: 1,5-difenil-1,4--pentadieno (**35**), *trans*-cinamil-1-fenil-2-propenil éter (**36**), dicinamil éter (**37**), cinamil-3-fenil-1-propenil éter (**38**) e cinamil-dihidro-cinamato (**39**).²³ A substância 1,5-difenil-1,4-

pentadieno também foi reportada posteriormente na *C. racemosa* em estudo mais recente.¹⁵

Em outro estudo, o qual igualmente utilizou-se a *C. racemosa*, constatou-se que dois novos *para*-xilenos prenilados sugeridos com sistema de anéis indano atípico reportaram-se pela primeira vez em espécie de alga marinha. O primeiro denominado de caulerprenilol-A (**40**), isolado como um pó branco amorfo e opticamente inativo, sua estrutura molecular é derivada de benzeno, simetricamente tetrasubstituído com dois grupos metil *para*-substituído e dois grupos *orto*-substituído de hidrometil-butenil, o segundo *para*-xileno nomeado caulerprenilol-B (**41**), molecularmente também é um derivado de benzeno *para*-disubstituído por grupo metil, sendo que ao anel benzeno está ligado um anel de cinco membro, o qual possui três substituintes que consiste nos grupos: isopropóxi-2 em C-15, isobuteno em C-9 e uma hidroxila em C-14.¹⁴

Para além desses, mais dois outros compostos do grupo dos *para*-xilenos, sendo eles rishitinol (**42**) e ocidol (**43**), evidenciando que substâncias com tais características são extremamente raros na natureza, e que a presença delas na *C. racemosa* torna a sua fonte de compostos secundários mais variada.¹² O ocidol também foi relatado em posterior estudo com *C. racemosa*.¹⁵

Para mais, nove compostos contendo cadeia carbônica derivada de fitol foram isolados da *C. racemosa*. Este estudo inclui três diterpenoides, um par de epímeros, denominado de racemobutenólidos α e β (**44**), porque possui um carbono quiral com estereoquímica indefinida e o 40,50-deidodicodiconema (**45**), além desses foram identificados os seguintes compostos: cacoespongionolídeo-C (**46**), 16-*trans*-fitol (**47**), 17-*trans*-fítol-acetato (**48**), dois compostos análogos (**49** e **50**) a este, α -tocoepirol-A (**51**), α -tocoespirona (**52**) e um composto isolado como um pó amorfo branco, estruturalmente semelhante ao composto conhecido como α -tocoferol, o diferencial se dá pela substituição da hidroxila do anel de benzeno presente no α -tocoferol pelo grupo 3,5-dimetilfenoxil. O composto tem por nome α -tocoxilenóxi (**53**), sendo esse o primeiro relato de produto natural com esse substituinte. Todos esses compostos foram identificados por dados de espectrometria.¹⁷

Outrossim, os metabólitos secundários, a alga *C. racemosa* apresentam substâncias que são precursoras de muitos produtos naturais, a exemplo disso, o trabalho com extrato de diclorometano (CH₂Cl₂), isolou e identificou as

seguintes substâncias, α e β tocoferol (**54a** e **54b**), o esqualeno (**55**) e ácido oleico (**56**).^{14,45}

Em uma espécie coletada na Costa do mar da China, *C. taxifolia* (Vahl) C. AGARDH, através do seu extrato de acetona, isolados e identificados, encontraram-se dois novos sesquiterpenos. Os quais contêm um esqueleto de carbono tipo valerenano aromático incomum, isto porque um composto muito semelhante a estes só tinha sido reportado na espécie *Valeria officinalis*, sendo nomeado de ácido Valeriano. Porém, o trabalho evidenciou a ocorrência de dois novos compostos com esqueleto Valeriano em alga marinha: o primeiro, nomeado de caulerpal-A (**57**), e o segundo caulerpal-B (**58**), ambos são bicíclicos, ou seja, tem dois anéis: um anel aromático e outro ligado a ele de cinco membros, o anel aromático nos dois compostos é paradissubstituído pelos grupos pernil e aldeído, enquanto que o outro anel é trissubstituído. No caulerpal-A os substituintes são metil e hidroxila em C-3 e éster metílico em C-2 e no caulerpal-B para C-3 são metil e metoxila e uma hidroxila em C-2,²⁵ esses compostos também foram relatados na espécie de *C. racemosa*.¹⁵ Num estudo continuado, desta vez utilizando *C. racemosa*, obteve-se um total de quatro isolados, entre eles um composto inédito, classificado com ácido graxo poliacetilênico (**59**) e um outro ácido graxo (**60**), semelhante com diferença apenas pela ausência do grupo éster terminal, os quais já foram reportados em outras espécies do Gênero como a *C. lentillífera*, *C. chemnitzia*, *C. taxifolia*, *C. faredi*.⁴⁶

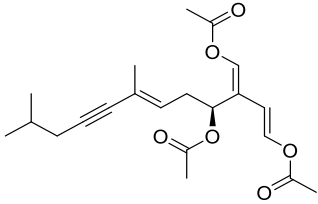
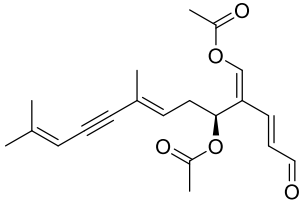
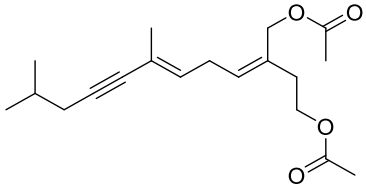
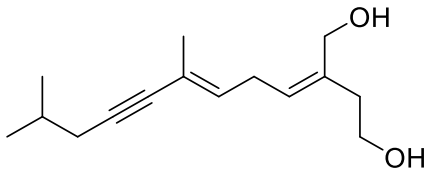
Por conseguinte, demais trabalhos com a *C. taxifolia*, mencionam-se os seguintes sesquiterpenos: o aldeído taxifolial A (**61**). Na molécula desse elemento, observa-se um desvio de ligação dupla do carbono 2 (C2) para o carbono 3 (C3) que altera o enol-éster para uma funcionalidade de éster alílico, isto torna esse composto isômero com **13**. O taxifolial B (**62**), é uma mistura de diastereoisômeros formadas pela oxidação do **12**, enquanto que o taxifolial C (**63**) é uma forma oxidada do **61**, mais ainda um aldeído inédito monoterpeneo do gênero *Caulerpa*, o taxifolial D (**64**) pode ser considerado como um produto de degradação da caulerpinina ou um precursor desses compostos citados.⁴⁷

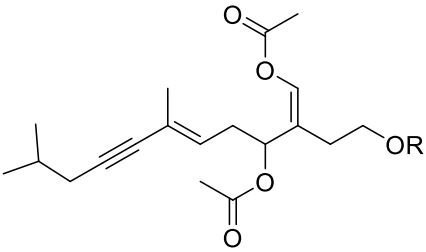
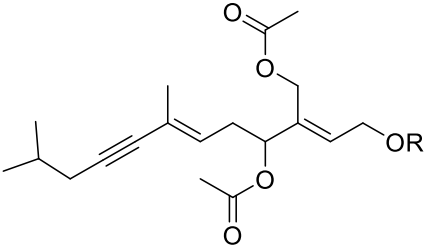
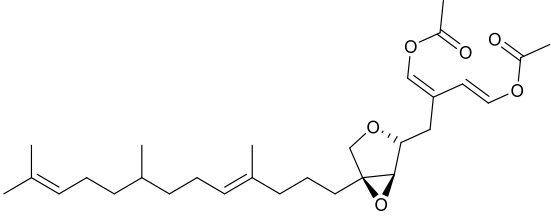
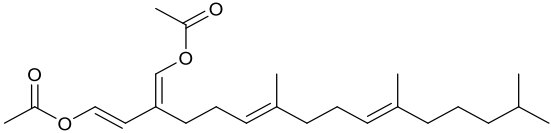
Neste gênero, algumas espécies apresentam diterpenos e sesquiterpenos, monocíclico e bicíclicos, os quais foram elucidados por análises de espectrometria, por isto sabe-se que a(s) estrutura (s) molecular (s) apresenta

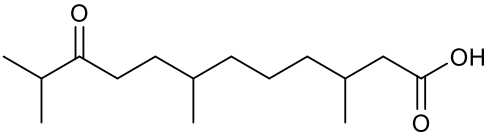
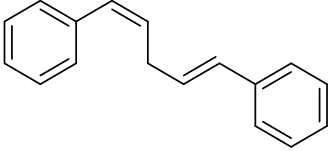
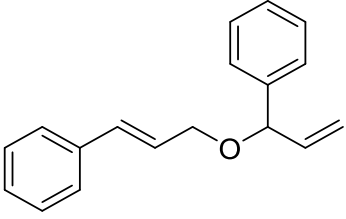
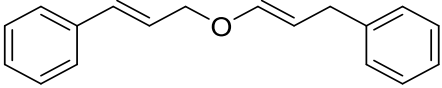
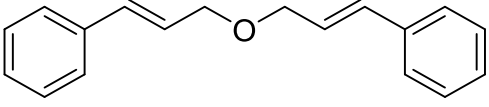
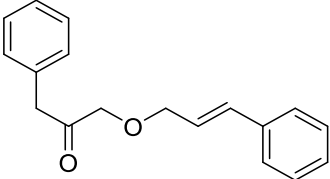
como grupo substituinte no anel principal um sistema de aceto-enol. Na *C. flexilis* encontrada na Austrália encontram-se dois desses compostos: um monoanelar (**65**) e outro bianelar (**66**).⁴⁸ Ao passo que na *C. ashmeadii*, coletada na costa das Filipinas, reportam-se oito compostos monoanelares, trissubstituídos que diferem entre si principalmente pelo ligante em C-2, o qual consiste numa cadeia carbônica insaturada com presença de éster e/ou aldeído terminal (**67 a 75**)^{32,44} e outro composto desse mesmo tipo foi reportado na *C. racemosa* (**76**).¹⁵ Todas as estruturas químicas desses terpenos supra citados estão listadas nos **Quadro 2**.

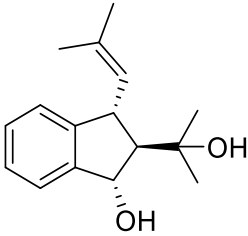
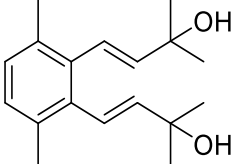
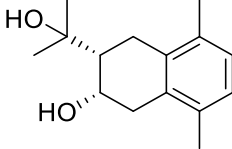
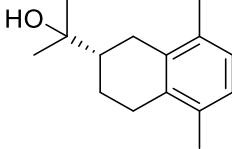
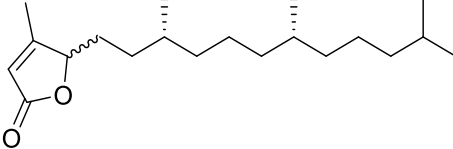
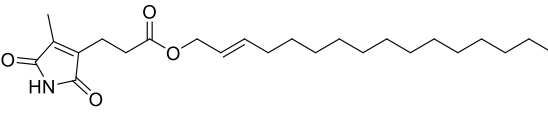
Outro grupo de compostos encontrados nessas algas são os esteroides, os quais constituem um grande grupo de compostos solúveis em gordura, contendo uma estrutura básica de dezessete átomos de carbono dispostos em quatro anéis ligados entre si. Reporta-se nesse gênero, o β -sitosterol (**77**)⁴⁵ e sete derivados de estigmasterol (**78 a 84**) isolados de *C. racemosa* entre eles o ergosterol.^{15,17} Além do mais, quatro esteroides conhecidos foram relatados, entre eles cleionasterol e ergosterol (**85 e 86**), os quais foi pela primeira vez mencionado em *C. racemosa* enquanto que os outros dois, fucosterol (**87**) e colesterol (**88**) têm distribuição mais ampla, sendo encontrados em outras espécies como *C. taxifolia*, *C. lentífera* e *C. sertulariodes*.^{15,22,41,46,49,50} Todas as estruturas químicas esteroides naturais supracitados estão listadas nos **Quadro 3**.

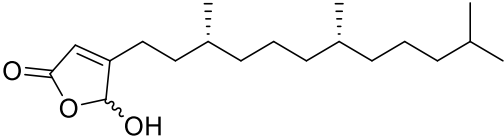
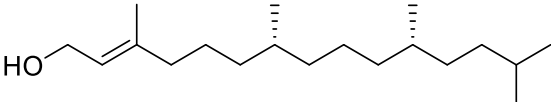
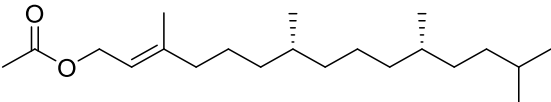
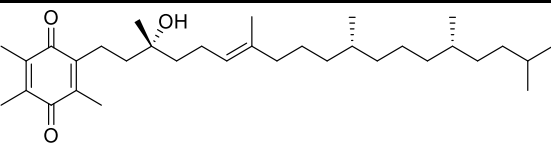
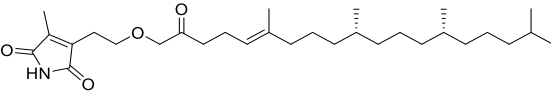
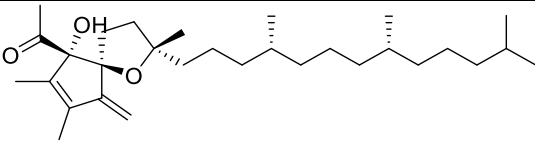
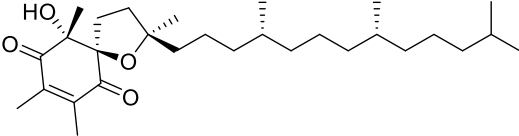
Quadro 2. Estruturas químicas de terpenos isolados no gênero *Caulerpa*

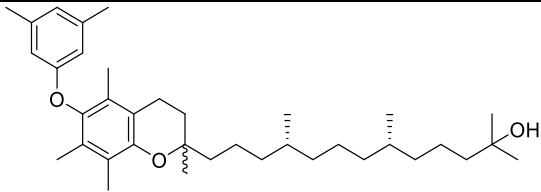
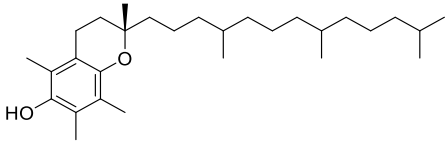
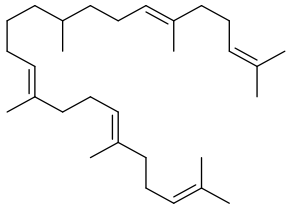
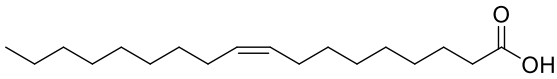
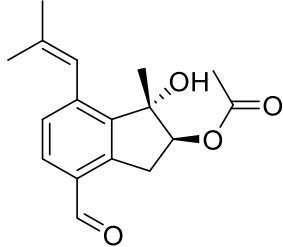
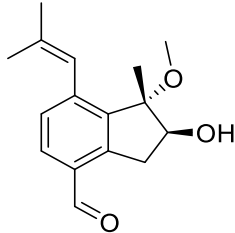
Estrutura (s) química (s)	Espécie (s) de <i>Caulerpa</i> /referência (s)
 12 Caulerpenina	<i>C. prolifera</i>, <i>C. racemosa</i> <i>C. taxifolia</i>^{25,40-42,47,48}
 13 Oxitoxina	<i>C. taxifolia</i>⁴⁷
 14 (<i>Z</i>)-2-((<i>E</i>)-4,8-dimetil-non-3-em-5-in-1- ilideno)-butano-1,4-diol-diacetato	<i>C. prolifera</i>⁴²
 15 (<i>Z</i>)-2-((<i>E</i>)-4,8-dimetil-non-3-em-5-in-1- ilideno)-butano-1,4-diol	<i>C. prolifera</i>⁴²

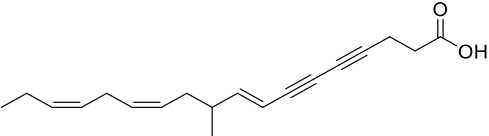
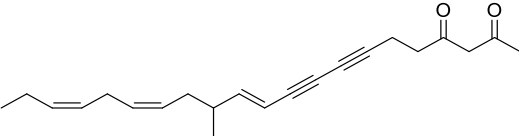
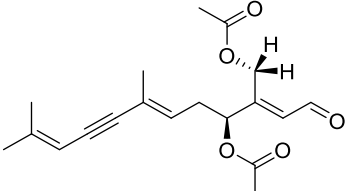
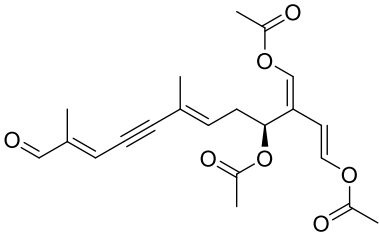
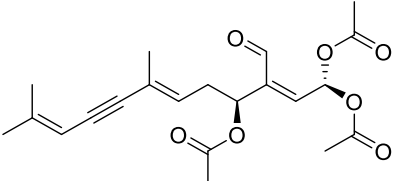
 2a $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_6(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ 2b $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ 2c $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_6(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}_3$ 2d $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{CH}_3$ 2e $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ 2f $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ 2g $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_4(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ 2h $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}_3$ 2i $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_3(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_3$	<i>C. prolifera</i>⁴⁰
 3a $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$ 3b $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ 3c $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ 3d $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_6(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ 3e $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}_3$ 3f $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$	<i>C. prolifera</i>⁴⁰
 32 Flexilin	<i>C. flexis, C. mexicana</i>^{43,44}
 33	<i>C. mexicana</i>⁴⁴

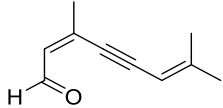
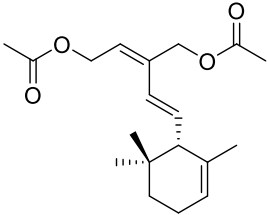
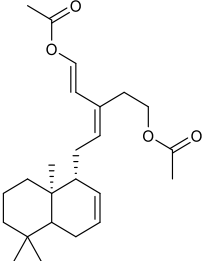
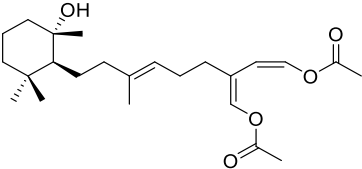
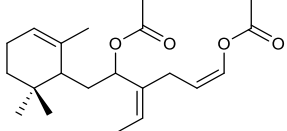
Trifarina	
 34 10-ceto-3,7,11-trimetildodecanoico	<i>C. racemosa</i>^{22,41}
 35 1,5-difenil-1,4-pentadieno	<i>C. racemosa</i>^{23,15}
 36 <i>trans</i>-cinamil-1-fenil-2-propenil éter	<i>C. racemosa</i>²³
 37 dycinamil éter	<i>C. racemosa</i>²³
 38 cinamil-3-fenil-1-pronoil éter	<i>C. racemosa</i>²³
 39 cinamil-dihidro-cinamato	<i>C. racemosa</i>²³

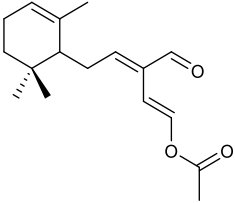
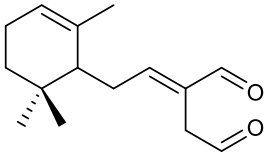
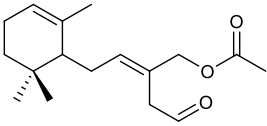
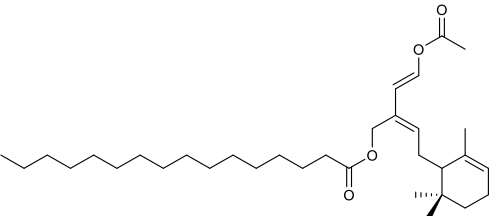
 40 Caulerprenilol-A	<i>C. racemosa</i>¹³
 41 Caulerprenilol-B	<i>C. racemosa</i>¹³
 42 Richitinol	<i>C. racemosa</i>¹³
 43 Ocidol	<i>C. racemosa</i>^{13,15}
 44 Racemobutenólidos α e β	<i>C. racemosa</i>¹⁷
 45 40,50-deidodicodiconema	<i>C. racemosa</i>¹⁷

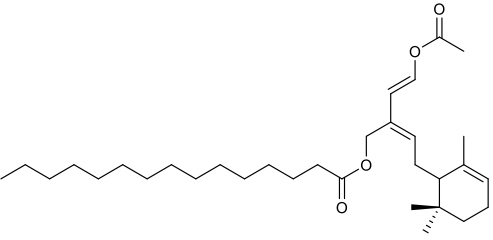
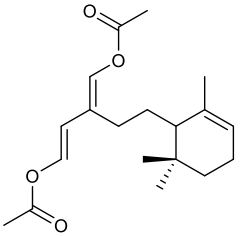
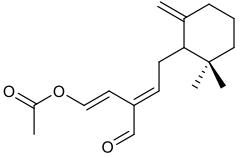
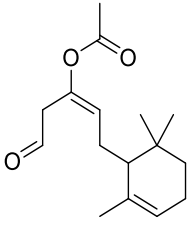
 46 Cacoespangionolideo-C	<i>C. racemosa</i> ^{17,46}
 47 16-<i>trans</i>-fitol	<i>C. racemosa</i> ^{17,46}
 48 17-<i>trans</i>-fitol-acetato	<i>C. racemosa</i> ¹⁷
 49 α-tocoferolquinona	<i>C. racemosa</i> ¹⁷
 50 4',5'-dihidrodioidictionema	<i>C. racemosa</i> ¹⁷
 51 α-tocoepsirol-A	<i>C. racemosa</i> ¹⁷
 52 α-tocoespirona	<i>C. racemosa</i> ¹⁷

 53 α-tocoxilenol	<i>C. racemosa</i> ¹⁷
 54 α-tocoferol	<i>C. racemosa</i> ⁴⁵
 55 Esqualeno	<i>C. racemosa</i> ⁴⁵
 56 Ácido oléico	<i>C. racemosa</i> ⁴⁵
 57 Caulerpal-A	<i>C. taxifolia</i> ²⁵
 58	<i>C. taxifolia</i> ²⁵

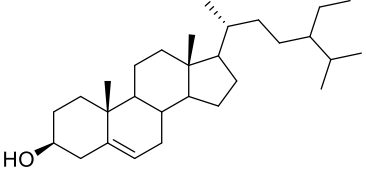
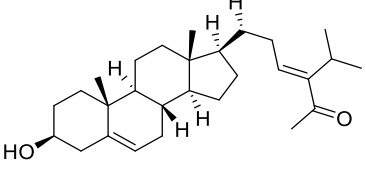
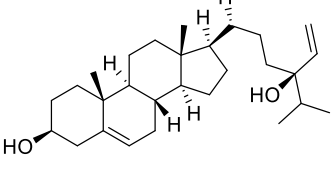
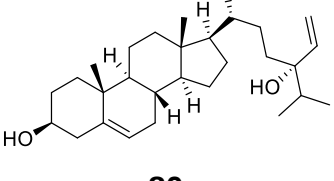
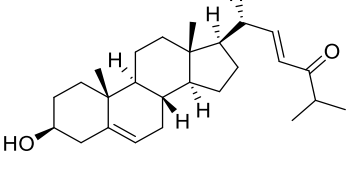
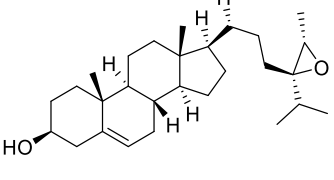
Caulerpal-B	
 59 (8<i>E</i>,12<i>Z</i>,15<i>Z</i>)-10-metiloctadeca- 8,12,15-trien-4,6-ácido dienoico	<i>C. racemosa</i> ⁴⁶
 60 (11<i>E</i>,15<i>Z</i>,18<i>Z</i>)-13-metilhenicosa- 11,15,18-trien-7,9-dieno-2,4-diona	<i>C. racemosa</i> ⁴⁶
 61 Taxifolial-A	<i>C. taxifolia</i> ⁴⁷
 62 Taxifolial-B	<i>C. taxifolia</i> ⁴⁷
 63 Taxifolial-C	<i>C. taxifolia</i> ⁴⁷

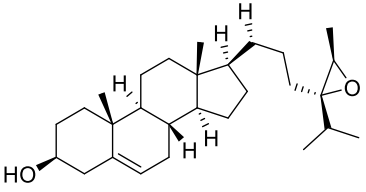
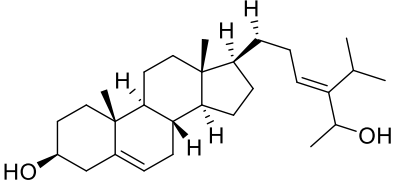
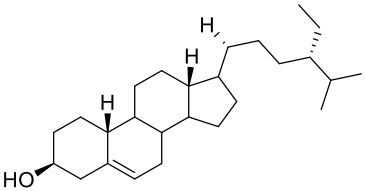
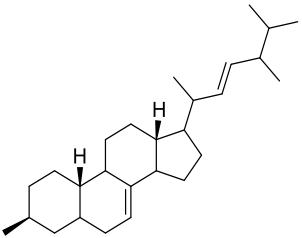
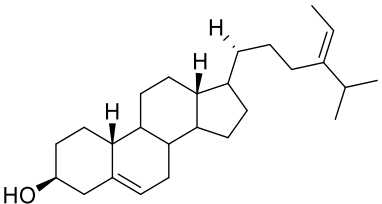
 64 Taxifolial-D	<i>C. taxifolia</i>⁴⁷
 65 (<i>E</i>)-2((<i>E</i>)-2-((<i>S</i>)-2,6,6-trimetilcicloex-2-eno-1-il)-vinil)-but-2-eno-1,4-diol diacetato	<i>C. flexilis</i>⁴⁸
 66 (1<i>E</i>,3<i>Z</i>)-3-(2-((1<i>R</i>,8<i>aS</i>)-5,5,8<i>a</i>-trimetil-1,4,4<i>a</i>,5,6,7,8,8<i>a</i>-octahidronaftaleno-1-il)-etildieno)-pent-1-eno-1,5-diil diacetato	<i>C. flexilis</i>⁴⁸
 67 (1<i>Z</i>,3<i>Z</i>)-2-((<i>E</i>)-6-((1<i>S</i>,2<i>S</i>)-2-hidroxi-2,6,6-trimetilcicloexil)-4-metilex-3-en-1-il)-buta-1,3-dieno-1,4-diil diacetato	<i>C. ashmeadii</i>⁴⁴
	<i>C. ashmeadii</i>³²

68 (1Z,4Z)-4-etilideno-6-(2,6,6-trimetilciclohex-2-en-il)-hex-1-eno-1,5-diil diacetato	
 69 (1E,3E)-3-formil-5-(2,6,6-trimetilciclohex-2-en-1-il)-penta-1,3-dien-1-il acetato	<i>C. ashmeadii</i>³²
 70 (E)-2-(2-(2,6,6-trimetilciclohex-2-en-1-il)-etilideno)-suquinaldeído	<i>C. ashmeadii</i>³²
 71 (E)-2-(2-oxoetil)-4-(2,6,6-trimetilciclohex-2-en-1-il)-but-2-en-1-il acetato	<i>C. ashmeadii</i>³²
 72 (Z)-2-((E)-2-acetoxivinil)-4-(2,6,6-trimetilciclohex-2-en-1-il)-but-2-en-1-il palmitato	<i>C. ashmeadii</i>³²

 73 (Z)-2-((E)-2-acetoxivinil)-4-(2,6,6-trimetilcicloex-2-em-1-il)-but-2-en-1-il pentadecanoato	<i>C. ashmeadii</i>³²
 74 (1E,3E)-2-(2,6,6-trimetilcicloex-2-em-1-il)-etil)-buta-1,3-dieno-1,4-diil diacetato	<i>C. ashmeadii</i>³²
 75 (1E,3E)-5-(2,2-dimetil-6-metilenocicloexil)-3-formilpenta-1,3-dien-1-il acetato	<i>C. ashmeadii</i>³²
 76 (E)-5-oxo-1-(2,6,6-trimetilcicloex-2-en-1-il)-pent-1-en-il acetato	<i>C. racemosa</i>¹⁵

Quadro 3: Estruturas químicas de esteroides isolados no Gênero *Caulerpa*

Estrutura (s) química (s)	Espécie (s)/referência
 77 β-sitosterol	<i>C. racemosa</i>^{15,45}
 78 Caulerpenona	<i>C. racemosa</i>¹⁷
 79 (24<i>R</i>)-saringosterol	<i>C. racemosa</i>¹⁷
 80 (24<i>S</i>)-saringosterol	<i>C. racemosa</i>¹⁷
 81 3β-hidroxicolesta-5,22(<i>E</i>)-dien-24-ona	<i>C. racemosa</i>¹⁷
 82	<i>C. racemosa</i>¹⁷

24S,28R-epóxifucosterol	
 83 24R,28S-epóxifucosterol	<i>C. racemosa</i> ¹⁷
 84 (3β,23E)-estigmasterol-5,3-dieno-3,28-diol	<i>C. racemosa</i> ¹⁷
 85 Cleionasterol	<i>C. racemosa</i> ⁴⁶
 86 Ergosterol	<i>C. racemosa</i> ^{15,41}
 87 Fucosterol	<i>C. racemosa</i> ^{17,46}

88 Cholesterol The chemical structure of cholesterol (88) is shown. It consists of a four-ring steroid nucleus. The first ring (leftmost) has a hydroxyl group (HO-) at the 3-position. The second ring has a double bond between carbons 5 and 6. The third ring has a methyl group (CH₃) at the 10-position. The fourth ring has a methyl group (CH₃) at the 13-position. A side chain is attached to the 17-position, consisting of an ethyl group and a branched alkyl chain (8-methylheptyl group).	<i>C. racemosa</i>⁴⁶
---	--

ATIVIDADES BIOLÓGICAS INVESTIGADAS NO GÊNERO *CAULERPA*

Nos últimos anos os extratos e alguns metabólitos secundários, como também frações de polissacarídeos de espécies do gênero *Caulerpa*, foram investigados e mostraram significativas propriedades terapêuticas.

Extratos e frações

De acordo com uma análise realizada com o extrato diclorometano de *C. prolifera*, pode-se notar uma atividade moderada a significativa contra seis espécies de bactérias marinhas não identificadas, entre elas: gram-positivas e gram-negativas. Ainda, avaliou-se, também, a inibição do crescimento da microalga *Phaedactylum tricornutum*, o que comprovou a eficácia biocida do extrato.⁴⁰

Outras pesquisas avaliaram o efeito fertilizante do extrato aquoso da *C. chemnitzia* em sementes de *Vigna sinensis* (feijão-de-corda). No qual, observou-se que as sementes, embebidas na solução extrativa, obtiveram uma melhoria no crescimento, incluindo os parâmetros de comprimento do broto e raiz, peso fresco, peso seco e na composição bioquímica, em comparação as sementes embebidas apenas com água.⁵¹ Por conseguinte, em um trabalho posterior, foi constatado que o efeito do extrato líquido da alga *C. scalpelliformis* no crescimento e nos constituintes bioquímicos de *Vigna mungo* em pequenas concentrações de extrato, ocasiona um aumento na porcentagem de germinação, no comprimento da parte aérea, no comprimento da raiz, além dos constituintes bioquímicos. Entre eles estão a clorofila, o carotenoide e o aminoácido da planta, sendo, portanto, uma excelente opção de fertilizante orgânico.⁵²

Ademais disso, trabalhos recentes verificaram a atividade antibacteriana *in vitro*. Utilizou-se extratos da *C. racemosa* obtidos com solventes de diferentes polaridades, os quais foram testados em ensaios por difusão em ágar contra as seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Todos os extratos apresentaram atividade antibacteriana moderada (zona de inibição < 15 mm), dos quais apenas o extrato butanólico apontou

atividade significativa, confirmando que esta alga pode ser usada como uma possível fonte de compostos antimicrobianos.⁵³

Isto posto, ainda foi possível constatar em um estudo divergente, os solventes hexano, clorofórmico, etilacetato, acetato, e metanol, usados para compor soluções extrativas de *C. chemnitzia*, *C. racemosa* e *C. scalpelliformis*. As quais foram avaliadas pelo método de difusão em disco, a fim de verificar a ação bacteriana, e relatou-se que quaisquer dos extratos das três espécies demonstraram ação bactericida moderada contra a bactéria *Enterococcus faecalis*, sendo o extrato de acetato de etila da *C. racemosa* o que teve maior atividade antibacteriana sugerindo, deste modo, o uso dele como agente antibacteriano para o tratamento de infecções causadas por *E. faecalis*.⁵⁴

Ao que tange as propriedades anti-inflamatórias, a literatura expõe as soluções aquosa e metanólica de *C. mexicana* como imunomoduladora em modelos *in vitro*, as quais agiram inibindo macrófagos a produzirem as citocinas pró-inflamatórias interleucina-6 (IL-6), IL-12 e Fator de necrose tumoral (TNF). Além disso, o mesmo grupo examinou o efeito anti-inflamatório *in vivo* indicando, pela primeira vez, que extratos da *C. mexicana* suprimiram a migração celular em modelos de peritonite e edema de orelha induzidos por irritantes químicos.⁵⁵

Em continuidade a este trabalho supracitado, a mesma equipe compôs soluções com diferentes solventes (metanol, acetato, hexano e clorofórmio) de *C. mexicana* e *C. sertularioides*, para esta última exceto o acetato de etila não foi usado, como resultado obtiveram as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória pronunciada em vários modelos de nocicepção (teste de contorção, teste de placa quente e teste de nocicepção induzido por formalina).⁵⁶

Para mais disso, um trabalho avaliando a atividade imunoestimulatória (*in vitro*), constatou um estímulo na proliferação de macrófagos e na produção da enzima oxido-nítrico sintase, ocasionado por quatro frações purificadas (CLGP1, CLGP2, CLGP3, CLGP4) oriundas da *C. lentillífera*, no meio delas a fração CLGP4 obteve melhor atividade.⁵⁷ Ademais, ainda com a mesma espécie, o efeito antidiabético do extrato etanólico foi avaliado e demonstrou possuir atividade significativa na diminuição das enzimas dipeptidil peptidase-IV e α -glucosidase, e um aumento significativo na secreção de insulina.⁵⁸

Com relação a atividade antinoceptiva, uma pesquisa investigou em diferentes modelos de nocicepção, o extrato metanólico bruto e as fases n-

butanólica, clorofórmica e acetato de etila de *C. racemosa*, os resultados demonstraram uma redução significativa na nocicepção produzida pelo ácido acético dos extratos em 47,39 %, 70,51 %, 76,11 % e 72,24 %, respectivamente. Ainda, realizou-se um ensaio em placa quente, cujas fases clorofórmicas e acetato de etila foram ativas. Na fase neurogênica do teste de formalina, observou-se que o extrato metanólico bruto, a fase *n*-butanólica e a fase clorofórmica foram eficazes em inibir a resposta nociceptiva. E na fase inflamatória, relatou-se que a fase acetato de etila foi capaz de inibir a resposta nociceptiva, apresentando um significativo efeito anti-inflamatório.⁵⁹

É possível afirmar, ainda, que estudos envolvendo frações polissacarídica sulfatadas obtidas de *C. cupressoides* var. *lycopodium*, a partir de digestão proteolítica e separadas em diferentes frações de polissacarídeos por cromatografia de troca aniônica, foram investigadas em relação à ação anticoagulante. Uma das frações mostrou atividade anticoagulante, além de antitrombótica nas doses de 1,0 e 2,0 mg / kg (peso corpóreo), e em concentrações maiores que 2,0 mg / Kg exibiu efeito pró-trombolítico, sendo este ensaio avaliado como modelo experimental de trombozes venosa em ratos.⁶⁰

Sendo assim, a priori, a ação anti-herpética *in vitro*, investigada usando fração polissacarídica sulfatada de *C. racemosa*, verificou-se a inibição da proliferação do herpes vírus simples tipo I (HSV-1) e tipo II (HSV-2), com concentração efetiva antiviral de cinquenta por cento.¹⁰

A posteriori, em outro trabalho, um polissacarídeo sulfatado de baixo peso molecular, conseguido a partir da mesma espécie, formou um complexo iônico com a enzima fosfolipase A2 presente no veneno de *Crotalus durissus*. Este complexo foi testado e apresentou aumento significativo na atividade da enzima, como também na atividade antibacteriana e no efeito edematogênico, assim, os resultados propõe uma aplicação prática do complexo como um agente antibacteriano natural para uso em humanos e animais.⁶¹ O mesmo grupo de pesquisa avaliou também a atividade leishmanicida do polissacarídeo sulfatado extraído da *C. racemosa*, coletada na costa de Fortaleza-Brasil, por meio de ensaios *in vitro*, e demonstrou a ação significativa destes polissacarídeos na inibição e no crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, obtendo um com valor de concentração inibitória (IC) em 34,5 µg / mL.⁶²

Além do mais, reporta-se outras ações biológicas para o Gênero *Caulerpa*, como por exemplo, a atividade larvicida significativa contra mosquitos *Aedes aegypti*, com extrato acetônico de *C. scalpelliformis* obtendo com um valor de concentração larvicida (LC) em 54 mg / L.⁶³ Pois, um posterior estudo relatou sobre o efeito larvicida do extrato etanólico da espécie *C. racemosa* contra as larvas do mosquito *A. aegypti*, com LC em $(0.0556 \pm 0.0103) \mu\text{g} / \text{mL}$.⁶⁴

Outrossim, o potencial osteogênico de amostras enriquecidas com polissacarídeos sulfatos de *C. prolifera* foi testado em células-tronco humanas, verificando-se o aumento da atividade enzimática (fosfatase alcalina) e por consequência, um acréscimo de cálcio na matriz extracelular, propondo um potencial osteogênico para estas amostras. Para mais, não exibiram ação genotóxica significativa, sugerindo-as para as terapias de regeneração óssea.⁶⁵

Posto isto, o Quadro 5 resume as principais atividades biológicas realizadas com extrato e frações de *Caulerpa*.

Quadro 5. Atividades biológicas dos extratos e frações do Gênero *Caulerpa*

Espécie (s) de <i>Caulerpa</i>	Extrato/fração	Atividade (s) biológica (s)/referência
<i>C. mexicana</i>	Metanólico, acetato, hexânico e clorofórmico	Antinociceptiva e anti-inflamatória ⁵⁶
<i>C. mexicana</i>	Metanólico e aquoso	Anti-inflamatória ⁵⁵
<i>C. sertularioides</i>	Metanólico, clorofórmico e hexânico	Antinociceptiva e anti-inflamatória ⁵⁶
<i>C. racemosa</i>	Metanólico e frações(<i>n</i> -butanólica, clorofórmica e acetato de etila)	Antinociceptiva ⁵⁸
<i>C. racemosa</i>	Metanólico, etanólico, butanólico, acetona, clorofórmico e diclorometano	Antibacteriana ⁵³
<i>C. racemosa</i>	Fração polissacarídica sulfatada	Antiviral ¹⁰
<i>C. racemosa</i>	Fração polissacarídica sulfatada	Antibactericida e endematogênica ⁶⁰
<i>C. racemosa</i>	Fração polissacarídica sulfatada	Leishmanicida ⁶¹
<i>C. racemosa</i>	Extrato etanólico	Larvicida ⁶³
<i>C. racemosa</i>	Acetato de etila	Antibacteriana ⁵⁴
<i>C. lentillífera</i>	Etanólico	Antidiabética ⁵⁸
<i>C. lentillífera</i>	Polissacarídica (CLGP1, CLGP2, CLGP3, CLGP4)	Imunomoduladora ⁵⁷
<i>C. cupressoides</i>	Polissacarídica sulfatada	Anticoagulante (antitrombótica e pro-trombolítica) ⁵⁹

<i>C. prolifera</i>	Diclorometano	Antibacteriana e Biocida ⁴⁰
<i>C. prolifera</i>	Polissacarídica sulfatada	Potencial osteogênico ⁶⁴
<i>C. chemnitzia</i>	Aquoso	Fertilizante ⁵¹
<i>C. scalpelliformis</i>	Acetônico	Larvicida ⁶²
<i>C. scalpelliformis</i>	Aquoso	Promotor de crescimento e aumento do valor nutricional da <i>Vigna mungo</i> ⁵²

Substâncias isoladas

Primariamente, a Caulerpenina, um metabólito majoritário da *C. taxifolia* fez-se anunciada, ela exibiu propriedades antibacterianas e antifúngicas, como também apresentou toxicidade para peixes, larvas e outros organismos marinhos.³² Outro composto isolado foi a caulerpina, pertencente à classe dos alcaloides e está presente na maioria das espécies desse gênero, um dos primeiros relatos do seu isolamento foi no ano de 1987. O composto foi obtido a partir dos extratos de várias espécies, principalmente da *C. sertularioides* e *C. racemosa*, verificou-se a eficiência desses extratos como promotor de crescimento, através do estímulo do crescimento da raiz e brotos em diferentes sementes de vegetais.⁶⁶

As substâncias caulerpina e ácido caulerpínico isoladas da *C. racemosa*, demonstraram ter atividade inseticida, à medida que aumentou a concentração das substâncias, e a ação foi proporcionalmente mais pronunciada.⁴¹ Em outra pesquisa, a caulerpina obtida da *C. lamouroux* manifestou ter ação contra o herpes simples vírus tipo I (HSV-1), por inibição da expressão de proteínas das fases alfa e beta do ciclo de replicação do vírus, sugerindo que a caulerpina é uma substância promissora para a terapia contra a HSV-1.⁶⁷

Constatou-se também que a caulerpina, extraída de *Caulerpa sertularioides* e *Caulerpa mexicana*, apresentou potencial antinociceptivo a partir da avaliação dos testes de contorção, teste de placa quente, dor induzida pela formalina, edema de orelha induzido por capsaicina e peritonite induzida por carragenina em camundongos⁶. Em estudo subsequente, o seu mecanismo de ação antinociceptivo foi avaliado e elucidado externando que ocorre pelas vias de ativação, as quais envolvem receptores alfa2-adrenoreceptores e receptores do tipo 5-HT₃, sendo indicado para desenvolvimento de novos fármacos analgésicos de dupla ação.⁶⁸

Em outra pesquisa, demonstrou-se pela primeira vez que caulerpina isolada de *C. sertularioides* e *C. mexicana* apresentou efeito espasmolítico não seletivo quando testada no íleo do porquinho da índia. De acordo com os achados, o efeito espasmolítico da caulerpina provavelmente envolve a inibição do influxo de Ca²⁺ através do canal de cálcio dependente da tensão.⁶⁹

As substâncias caulerchlorin e monometil caulerpinato tem ação antifúngica contra *Cryptococcus neoformans*, enquanto 2-5 tem ação anti-inflamatória.³⁸ Em trabalhos contínuos este mesmo grupo verificou que os caulerprenilóis A e B apresentaram atividade antifúngica moderadamente seletiva contra oito espécies fungos,¹³ ao passo que as substâncias racemosins A e C mostraram efeito neuroprotetor potente contra o dano celular induzido por A-beta₂₅₋₃₅ e atividade inibitória contra a PTP1B (uma grande família de enzimas de sinalização que controlam várias funções celulares fundamentais), respectivamente.¹⁶

Ademais, um estudo atribuiu, inicialmente, o potencial dos metabólitos caulerpina e ácido caulerpínico oriundo de *C. cylindracea*, como estratégia de tratamento do carcinoma ovariano humano, os resultados mostraram que os dois compostos inibiram seletivamente o complexo mitocondrial II.⁷⁰

Em outros experimentos mais recentes, tendo a caulerpina isolada de *C. racemosa* como substrato de partida, realizou-se a semi-síntese de quatorze análogos dela, dentre esses, doze foram reportados pela primeira vez na literatura. O processo deu-se por reações de substituição na posição N-indólica por grupos alquil, benzil, alil, propargil e acetato de etil, mono e di substituídos, assim como a obtenção de seus derivados ácidos, tal estudo mostrou que sete dos análogos semissintéticos foram capazes de promover diminuição do efeito citotóxico do protótipo e/ou maior atividade antiviral frente ao vírus herpes humano tipo I, além do que uma mistura de análogos exibiu potente atividade antifúngica frente as cepas de *Candida* spp..²⁶ Para mais uma lectina extraída da *C. cupresssoides* foi positiva para efeito antinociceptivo e anti-inflamatório na articulação temporomandibular de ratos quando administrada como pré-tratamento nesse modelo de inflamação induzida, visto que promoveu a redução da hipernocicepção inflamatória.⁷¹

Por fim, uma análise realizada com novos derivados sintéticos de alquilamida, tendo com substrato de partida, a racemosina-B, um alcaloide indólico natural, originalmente isolado da alga *C. racemosa* evidenciou que essas substâncias sintéticas possuem uma atividade de moderada a forte na inibição do crescimento de células cancerígenas de mama humano.⁷²

De forma sucinta as atividades das substâncias isoladas estão listadas no Quadro 6.

Quadro 6. Atividades biológicas atribuídas substâncias isoladas do gênero

Espécie (s) de <i>Caulerpa</i>	Composto(s) isolado (s)	Atividade (s) biológica (s)/referência
<i>C. racemosa</i>	Caulerpina	Antinoceptiva e anti-inflamatória ⁶⁷
<i>C. racemosa</i>	Caulerprenilol A e B	Antifúngica ¹³
<i>C. racemosa</i>	Racemosina A e C	Neuroprotetor ¹⁷
<i>C. racemosa</i>	Caulerpina e ácido caulerpínico	Atividade insecticida ⁴¹
<i>C. racemosa</i>	Caulerpina e análogos	Atividade antifúngica e antiviral ²⁶
<i>C. racemosa</i> e <i>C. sertularioides</i>	Caulerpina	Promotor de crescimento de plantas ⁶⁵
<i>C. taxifolia</i>	Caulerpenina	Antibacteriana e antifúngica ³²
<i>C. taxifolia</i>	Caulerpina	Inibição da proteína tirosina fosfatase 1B ²⁵
<i>C. lamouroux</i>	Caulerpina	Ação contra o herpes simples vírus tipo I (HSV-1) ⁶⁶
<i>C. cupressoides</i>	Lectina (CcL)	Antinociceptiva e Anti-inflamatória ⁷¹
<i>C. sertularioides</i> e <i>C. mexicana</i>	Caulerpina	Efeito espasmolítico ⁶⁹
<i>C. cylindracea</i>	Caulerpina e Ácido caulerpínico	Tratamento do carcinoma ovariano humano ⁷⁰
<i>C. racemosa</i>	Racemosina-B e derivados	Atividade anticancerígena ⁷²

CONCLUSÃO

O Gênero *Caulerpa* possui perfil químico amplamente diversificado, sendo descritos substâncias das classes dos alcaloides (tipo indólicos), dos terpenos, os quais têm conteúdo mais amplo, tendo derivados de sesquiterpenos acetilênicos, derivados aromáticos, compostos inspirados em esqueleto valeriano, ácidos graxos, diterpenos e terpenos cíclicos, o qual inclui tanto substâncias monocíclicas, quanto bicíclicas. Não somente isso, mais também possui esteróides, um deles amplamente distribuído em muitas espécies vegetais, o colesterol e os outros derivados de estigmasterol. Entre eles destacam-se o ergosterol, fucosterol e cleionasterol.

Dentre as espécies do gênero *Caulerpa racemosa*, a mais estudada em termos de atividade biológica, exibe propriedades antibacteriana, antiviral e endematogênica. Por conseguinte a *C. mexicana*, *C. prolifera*, *C. lentillífera*, *C. sertularioides*, *C. cupressoides*, *C. chemnitizia* e *C. scalpelliformes*, as quais foram testadas e comprovadas as atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, antidiabética, imunomoduladora, osteogênica, fertilizante e promotora de crescimento de sementes.

A caulerpina foi a substância isolada mais testada em ensaios biológicos, (antinociceptiva, anti-inflamatória, antifúngica, antiviral, espasmolítica, anticancerígena, inseticida e promotora de crescimento em vegetais), seguida pelo ácido caulerpínico (anticancerígena e inseticida), caulerprenilóis A e B (antifúngica), racemosina A e C (neuroprotetora), racemosina-B (anticancerígena) e caulerpenina (antibacteriana e antifúngica).

Destarte, segundo os dados supracitados, é possível inferir que o Gênero *Caulerpa* é abundante em diversidade química, ademais de propriedades biológicas. Dessa forma, portanto, faz-se necessário mais estudos para explorar suas substâncias em diferentes áreas de impactos econômicos, seja para compor alimentos nutracêuticos, seja para produção de novos fármacos e/ou produtos que promovam bem-estar para o homem e animais.

Referências bibliográficas

1. Wynne, M. J. *A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical Western Atlantic: second revision*. Beih. Nova Hedw, 2005.
2. Perreira, S. M. B.; *Algas bentônicas do estado de Pernambuco. Diagnóstico da diversidade de Pernambuco*, Massangana: Recife, 2002.
3. Oliveira-Carvalho, M. F.; Perreira, S. M. B.; Zickel, C. S.; *Hoehnea* **2003**, 30, 201.
4. <http://www.algaebase.org>; acessada em Fevereiro 2020.
5. De Gaillande, C.; Payri, C.; Remoissenet, G.; Zubia, M.; *J. Appl. Phycol.* **2017**, 29, 2249.
6. Teixeira, V. L.; *Rev. Virtual Quim.* **2013**, 5, 343.
7. Zubia, M.; Draisma, S. G. A.; Morrissey, K. L.; Varela-Álvarez, E.; De Clerck, O.; *J. Appl. Phycol.* (2019), doi: 10.1007/s10811-019-01868-9.
8. Fleurence, J.; Morancais, M.; Dumay, J.; Decottignies, P.; Turpin, V.; Munier, M.; Garcia-Bueno, N.; Jaouen, P.; *Trends Food Sci Technol* **2012**, 27, 57.
9. Hayakawa, Y.; Hayashi, T.; Lee, J.; Srisomporn, P.; Maeda, M.; Ozawa, T.; Sakuragawa, N.; *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1543, 86.
10. Ghosh, P.; Adhikari, U.; Ghosal, P. K.; Pujol, C. A.; Carlucci, M. J.; Damonte, E. B.; Ray, B.; *Phytochemistry* **2004**, 65, 3151.
11. Wells M. L.; Potin, P.; Craigie, J. S.; Raven, J. A.; Merchant, S. S.; Helliwell, K. E.; Smith, A. G.; Camire, M. E.; Brawley, S. H.; *J. Appl. Phycol.* **2017**, 29, 949.
12. <http://pubs.rsc.org/marinlit/>; acessada em Fevereiro 2020.
13. Liu, D.; Mao, S.; Zhang, H.; Yu, X.; Feng, M.; Wang, B.; Feng, L.; Guo, Y.; *Fitoterapia* **2013**, 91, 15.
14. Liu, A.; Liu, D.; Liang, T.; Yu, X.; Feng, M.; Yao, L.; Fang, Y.; Wang, B.; Feng, L.; Zhang, M.; Mao, S.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 2491.
15. Ornano, L.; Donno, Y.; Sanna, C.; Ballero, M.; Serafini, M.; Bianco, A.; *Nat. Prod. Res.* (2014), doi: 10.1080/14786419.2014.945928.
16. Yang, H.; Liu, D.; Liang, T.; Li, J.; Liu, A.; Yang, P.; Lin, K.; Yu, X.; Guo, Y.; Mao, S.; Wang, B.; *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2014**, 16, 1158.
17. Yang, P.; Liu, D.; Liang, T.; Li, J.; Zhang, H.; Liu, A.; Guo, Y.; Mao, S.; *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 38

18. Mcconnell, O. J.; Hughes, P. A.; Targett, N.M.; Daley, J.; *J. Chem. Ecol.* **1982**, 8, 1437.
19. Vest, S. E.; Dawes, C. J.; Romeo, J T.; *Botanica Marina* **1983**, 26, 313.
20. Cheng, F.; Zhou, Y. Wu, J.; Zhou, K.; *Shizhen Guoyi Guoyao* **2008**, 9, 856.
21. Vidal, J. P.; Laurent, D.; Kabore, S.A.; Rechencq, E.; Boucard, M.; Girard, J.P.; Escale, R.; Rossi, J.C.; *Botanica Marina* **1984**, 27, 533.
22. Anjaneyulu, A. S. R.; Prakash, C. V. S.; Mallavadhani, U. V.; *Phytochemistry* **1991**, 30, 3041.
23. Anjaneyulu, A. S. R.; Pracash, C. V. S.; Raju, K. V. S.; Mallavadhani, U. V.; *J. Nat. Prod* **1992**, 4, 496.
24. Schroder, H. C.; Badria, F. A.; Ayyad, S. N.; Batel, R.; Wiens, M.; Hassanein, H. M. A.; Kurelec, B.; Muller, W. E. G.; *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **1998**, 5, 119.
25. Mao, S.C., Guo, Y.W., Shen, X.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2947.
26. Castro, G. M. F. A.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal da Paraíba, Brasil, 2017.
27. Lorenzo, V. P.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal da Paraíba, Brasil, 2010.
28. Lucena, A. M. M.; Souza, C. R. M.; Jales, J. T.; *Mar. Drugs* **2018**, 16, 1.
29. Aguilar-Santos, G.; *J. Chem. Soc.* **1970**, 842.
30. Lunagariya, J.; Bhadja, P.; Zhong, S.; Vekariya, R.; Xu1, S.; *Mini-Rev. Med. Chem.* **2019**, 19, 751.
31. Nielsen, P. G.; Carlé, J. S.; Christophersen, C.; *Phytochemistry* **1982**, 21, 1643.
32. Paul, V. J.; Littler, M. M.; Littler, D. S.; Fenical, W.; *J. Chem. Ecol.* **1987**, 13, 1171.
33. Su, J-Y.; Zhu, Y.; Zeng, L-M.; Xu, X.-H.; *Natural Products Reports*, **1997**, 60, 1043.
34. Miki, Y.; Aoki, Y.; Miyatake, H.; *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 5215.
35. Fresneda, P. M.; Molina, P.; Angeles, S. M.; *Synlett* **1999**, 10, 1652.
36. Bourderioux, A.; Routier, S.; Beneteau, V.; *Tetrahedron Lett* **2007**, 63, 9465.

37. Meragelman, K. M.; West L. M.; Northcote, P. T; Pannell, L. K.; Mckee, T. C.; Boyd, M. R.; *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 6671.
38. Liu, D.; Mao, S.; Yu, X.; Feng, L.; Lai, X.; *Heterocycles* **2012**, 85, 661.
39. Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia vegetal*, 4.ed. Artmed: Porto Alegre, 2009.
40. Smyrniotopoulos, V.; Abatis, D.; Tziveleka, L.; Tsitsimpikou, C.; Roussis, V.; Loukis, A.; Vagias, C.; *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 21.
41. Alarif, W. M.; Abou-Elnaga, Z. S.; Ayyad, S. N.; Al-Lihaibi, S. S.; *CLEAN – Soil, Air, Water* **2010**, 38, 548.
42. Amico, V.; Oriente, G.; Piattelli, M.; Trinyali, C.; *Tetrahedron Lett.* **1978**, 38, 3593.
43. Blackman, A. J.; Wells, R. J.; *Tetrahedron Lett.* **1978**, 33, 3063.
44. Paul, V. J.; Fenical, W.; *Phytochemistry* **1985**, 24, 2239.
45. Ragasa, C. Y. Ebajo Jr., V. D.; Lazaro- Llanos, N.; Brkljača, R.; Urban, S.; *Pharm. Lett.* **2015**, 7, 122.
46. Mao, S. C.; Liu, D.; Yu, X.; Lai, X.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2011**, 39, 253.
47. Guerreiro, A.; Meinesz, A.; D`Ambrosio, M.; Pietra, F.; *Helv. Chim. Acta* **1992**, 75, 689.
48. Capon, R. J., Ghisalberti, E. L., Jefferies, P. R.; *Phytochemistry* **1983**, 22, 1465.
49. Aknin, M.; Moellet-Nzaou, R.; Kornprobsm, J. M.; Gaydou, E. M.; Samb, A.; Miralleq, J.; *Phytochnistry* **1992**, 31, 4167.
50. Valls, R.; Artaud, J.; Archavlis, A.; Vicente N.; Piovetti, L.; *Oceanol. Acta* **1994**, 17, 223.
51. Sivasankari, S.; Venkatesalu, V.; Anantharaj, M.; Chandrasekaran, M.; *Bioresour. Technol.* **2006**, 97, 1745.
52. Kalaivanan, C.; Chandrasekaran, M.; Venkatesalu, V.; *Phycological Society* **2012**, 42, 46.
53. Srivastava, N.; Saurav, K.; Mohanasrinivasan, V.; Kannabiran, K.; Singh, M.; *Br. J. Pharm. Toxicol.* **2010**, 1, 72.
54. Chandrasekaran, M.; Venkatesalu, V.; Raj, G. A.; *J. Coastal Life Med.* **2014**, 2, 940.

55. Bitercourt, M. A. O.; Dantas, G. R.; Lira, D. P.; Barbosa-Filho, J. M.; Miranda, G. E. C.; Santos, B. V. O.; Souto, J. T.; *Mar. Drugs* **2011**, 9, 1332.
56. Da Matta, C. B.; Souza, É. T.; Queiroz, A. C.; Lira, D. P.; Araújo, M. V.; Cavalcante-Silva, L. H. A.; Miranda, G. E. C.; Araújo-Júnior, J. X.; Barbosa-Filho, J. M.; Santos, B. V. O.; Alexandre-Moreira, M. S.; *Mar. Drugs* **2011**, 9, 307.
57. Sun, Y.; Gong, G.; Guo, Y.; Wang, Z.; Song, S.; Zhu, B.; Zhao, L.; Jiang, J.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, 109, 314.
58. Sharma, B. R.; Rhyu, D. Y.; *Asian Pac J Trop Biomed* **2014**; 4, 575.
59. Souza, E. T.; Queiroz, A. C.; Miranda, G. E.; Lorenzo, V. P.; Silva, E. F.; Freire-Dias, T. L. M.; Cupertino-Silva, Y. K.; Melo, G. M. A.; Santos, B. V. O.; Chaves, M. C. O.; Alexandre-Moreira, M. S.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2009**, 19, 115.
60. Rodrigues, J. A. G.; Vanderlei, E. S. O.; Bessa, E. F.; Magalhães, F. A.; Paula, R. C. M.; Lima, V.; Benevides, N. M. B.; *Braz. Arch. Biol. Technol* **2011**, 54, 691.
61. Pires, C. L.; Rodrigues, S. D.; Bristot, D.; Gaeta, H. H.; Toyama, D. O.; Farias, W. R. L.; Toyama, M. H.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2013**, 23, 635.
62. Pires, C. L.; Rodrigues, S. D.; Bristot, D.; Gaeta, H. H.; Toyama, D. O.; Farias, W. R. L.; Toyama, M. H.; *Mar. Drugs* **2013**, 11, 934.
63. Thangam, T. S.; Kathiresan, K.; *Botanica Marinha* **1991**, 34, 433.
64. Ali, M. Y. S.; Ravikumar, S.; Beula, J. M.; *Asian Pac. J. Trop. Dis.* **2013**, 3, 196.
65. Chaves-Filho, G. P.; Sousa, A. F. G.; Câmara, R. B. G.; Rocha, H. A. O.; Medeiros, S. R. B.; Moreira, S. M. G.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, 114, 565.
66. Raub, M. F.; Cardellina, J. H., II; Schwede, J. G.; *Phytochemistry* **1987**, 26, 619.
67. Macedo, N. R. P.; Ribeiro, M. S.; Villaça, R. C.; Ferreira, W.; Pinto, A. M.; Teixeira, V. L. Cirne- Santos, C.; Paixão, I. C. N. P.; Giongo, V.; *Revista Brasileira de Farmacologia* **2012**, 22, 861.
68. Souza, E. T.; Lira, D. P.; Queiroz, A. C.; Silva, J. C. S.; Aquino, A. B.; Mella, E. A. C.; Lorenzo, V. P.; Miranda, G. E. C.; Araújo-Junior, J. X.; Chaves, M. C. O.; Barbosa-Filho, J. M.; Athayde -filho, P. F.; Santos, B. V. O.; Alexandre-Moreira, M. S.; *Mar. Drugs* **2009**, 7, 689.
69. Cavalcante-Silva, L. H. A.; Falcão, M. A. P.; Vieira, A. C. S.; Viana, M. D. M.; Araújo-Júnior, J. X.; Sousa, J. C. F.; Silva, T. M. S.; Barbosa-Filho, J. M.; Noël, F.; Miranda, G. E. C.; Santos, B. V. O.; Alexandre-Moreira, M. S.; *Molecules* **2014**, 19, 14699.

- 70.** Cavalcante-Silva, L. H. A.; Correia, A. C. C.; Barbosa-Filho, J. M.; Silva, B. A.; Santos, B. V. O.; Lira, D. P.; Sousa, J. C.; Miranda, G. E. C.; Cavalcante, F. A.; Alexandre-Moreira, M. S. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 1553.
- 71.** Ferramosca, A.; Conte, A.; Guerra, F.; Feline, S.; Rimoli, M. G.; Mollo, E.; Zara, V.; Terlizzi, A.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *473*, 1133.
- 72.** Rivanor, R. L. C.; Val, D. R.; Ribeiro, N. A.; Silveira, F. D., Assis, E. L.; Franco, A. X. Vieira, L. V.; Queiroz, I. N. L.; Chaves, H. V.; Bezerra, M. M.; Benevides, N. M. B.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *115*, 331.